

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Design und Entwicklung molekularbiologischer Modelle zur Charakterisierung der
Mobilität des *Clostridium difficile* IStroms Cd/St1

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Morad Tajjiou
aus Kbdana/Marokko

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungen:	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Clostridium difficile.....	10
1.1.1 Clostridien	10
1.1.2 Clostridium difficile als Krankheitserreger.....	10
1.1.3 <i>C. difficile</i> assoziierte Erkrankungen (CDAD).....	11
1.2 Große clostridiale Zytotoxine (LCTs)	14
1.2.1 Molekularer Aufbau von TcdA und TcdB	14
1.2.2 Zelluläre Aufnahme der Clostridium difficile Toxine A und B	15
1.2.3 Klassifizierung der LCTs und Darstellung der enzymatischen Aktivität.....	17
1.2.4 Genregulation der Toxingene tcdA und tcdB.....	19
1.3. Mobile genetische Elemente	21
1.3.1. IS-Elemente und Transposons als mobile genetische Elemente	21
1.3.1.1. Insertionselemente	22
1.3.1.2 Transposons	23
1.3.1.3. Transpositionsmechanismen.....	24
1.3.2. Introns.....	26
1.3.2.1. Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns.....	27
1.3.2.2. Spleißmechanismus und Aufbau von Gruppe-I-Introns	28
1.3.2.4 Weitere, in nativen Gruppe-I-Introns vorkommende Reaktionen.....	29
1.3.2.5 Mobilität bei Gruppe-I-Introns.....	30
1.3.2.6 „Intron Homing“	30
1.3.2.7 Reverses Spleißen.....	31
1.3.2.8 Die „Introns Early“-Theorie	32
1.3.2.9. Die „Introns Late“-Theorie	33
1.3.2.10. „Introns Early“ vs. „Introns Late“– gibt es einen gemeinsamen Nenner?.....	34
1.4. CdlSt1 – eine Chimäre aus zwei mobilen genetischen Elementen.....	34
1.4.1 Der Insertionselementanteil	35
1.4.1.1 Mobilität und Transpositionsmechanismen bei IS-Elementen aus der IS200/IS605-Familie	37
1.4.2 Struktur und Funktion des Intronanteils von CdlSt1	39
1.4.2 Charakteristika von Gruppe-I-Introns.....	40
1.4.3. Struktur und Funktion des Intronanteils von Cd/St1	41
1.5 Vorteile der chimären Struktur von CdlSt1	42
1.5.1 Wechselbeziehung zwischen der Intron-Komponente und der Transposase	45
1.6 Varianten des IStrons.....	45
2 Ziel der Untersuchung	48

3 Materialien und Methoden.....	50
3.1 Materialien.....	50
3.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	50
3.1.1.1 Chemikalien	50
3.1.1.2 Enzyme.....	50
3.1.2 Bakterien	50
3.1.3 Plasmide und DNA	51
3.2 Methoden	51
3.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	51
3.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i>	51
3.2.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	52
3.2.1.3 Herstellen von elektrokompetenten Zellen.....	52
3.2.1.4 Elektroporation	53
3.2.1.5 Hitzeschocktransformation	53
3.2.1.6 Kulturmedien und Anzucht von Listerien.....	53
3.2.1.7 Lagern von <i>Listerien</i>	54
3.2.1.8 Protoplasten-Transformation von Listerien	54
3.2.1.8.1 Präparation der Protoplasten.....	54
3.2.1.8.2 Transformation der Protoplasten.....	55
3.2.1.9 Plasmidpräparation aus Listerien	57
3.2.2 Arbeiten mit DNA	57
3.2.2.1 Präparation von DNA.....	57
3.2.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	57
3.2.2.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	58
3.2.2.2 Modifikation von DNA.....	58
3.2.2.2.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen	58
3.2.2.2.2 Dephosphorylierung.....	59
3.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	59
3.2.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegel	59
3.2.2.5 Isolation von DNA aus Agarosegel.....	59
3.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	60
3.2.2.7 PCR.....	60
3.2.2.8 DNA-Sequenzierung.....	60
3.2.2.9 Sequenzierreaktion	61
3.2.2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.2.2.11 Auswertung	62
3.3 Arbeiten mit RNA	62
3.3.1 Allgemeines zum Arbeiten mit RNA.....	62
3.3.2 Vorbehandlung von Geräten	62

3.3.3 Umgang mit Chemikalien und Lösungen	63
3.3.4 <i>In-vitro</i> -Transkription und autokatalytische Spleißreaktion.....	63
3.3.4.1 Präparation der Template DNA.....	63
3.3.4.2 <i>In-vitro</i> -Transkription zur Herstellung von pre-mRNA:	63
3.3.4.3 Spleißreaktion:.....	64
3.3.5 cDNA-Synthese und RT-PCR.....	65
3.3.5.1 Vorbereiten der RNA	65
3.3.5.2 Synthese der cDNA	66
3.3.5.3 PCR zur Amplifikation des zu untersuchenden Abschnittes	66
3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Polyacrylamidgel.....	66
3.3.6.1 Gießen des Gels	66
3.3.6.2 Elektrophoretische Auftrennung	67
3.3.6.3 Färben des Gels.....	67
3.3.7 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	68
4 Ergebnisse.....	69
4.1 Die CdlSt1-0-Varianten als Ausgangsvariante zur Untersuchung der Mobilität des IStrons CdlSt1	69
4.2 Generierung der IStron-catP-Konstrukte.....	71
4.2.1 Entfernung des Stop-Codons und Einführen einer <i>NcoI</i> -Restriktionsschnittstelle in P2- und P9.1-Stem-Loop des Typ-0-IStrons CdlSt1a-SE918	72
4.2.2 Funktionelle Analyse der <i>NcoI</i> -P2 und <i>NcoI</i> -P9.1 IStron-Konstrukte	75
4.2.3 Umklonierung des IStrons in den pTZ19R-Vektor.....	78
4.2.4 Einführen der <i>catP</i> -Box in P2- und P9.1 des Typ 0 IStron	81
4.2.5 Generierung und Einklonieren des p23-Promotors	84
4.2.6 Funktionelle Analyse des IStron- <i>catP</i> Konstrukts.....	88
4.2.7 Deletionen des TlpA und TlpB aus den Konstrukten p23-IStron-P2 <i>catP</i> (+/-) und p23-IStron-P9.1 <i>catP</i> (+/-)	90
4.3 Untersuchung im Modelorganismus <i>L. innocua</i>	96
4.3.1 Umklonieren der <i>catP</i> -Konstrukte in das Suizidplasmid	97
pAUL-A.....	97
4.3.2 Transformation der pMO-4-Konstrukte in <i>L. innocua</i>	98
4.3.3 Kontrolle der pMO-4-Konstrukte nach Transformation in <i>L. innocua</i>	98
4.3.4 Funktionelle in-vivo-Analyse des P9.1 <i>catP</i> + Konstrukts	100
4.3.5 Wachstumskontrolle in Flüssigmedium	101
4.3.6 Wachstumskontrolle auf Selektivplatten	104
4.3.7 Plasmid-nicht-replizierenden Bedingungen	106
5 Diskussion	109
5.1 Mobilität des IStrons CdlSt-1	109
5.1.1. IStron Typ-0-Variante.....	112

5.1.2. Einfluss von Punktmutationen in den peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 .	113
5.2. Chloramphenicol-Resistenz Gen <i>catP</i> als Markergen	113
5.2.1. Einfluss des <i>catP</i> -Gens in P2- und P9.1-Stem-Loop	115
5.3. <i>Listeria innocua</i> als Modell-Organismus	115
5.3.1 Generierung und Einklonieren des p23-Promotors	116
5.3.2. Funktionalität des p23-Promotor und Expression des <i>catP</i> -Gen in <i>L. innocua</i>	120
5.4 Wachstumskontrolle in Flüssigmedium	121
5.4.1 Plasmid-replizierenden Bedingungen.....	121
5.4.2 Plasmid-nicht-replizierenden Bedingungen	122
5.5 Hypothese zur Entstehung von CdiSt1	122
5.6 Die Rolle von CdiSt1 in der „Introns early“- und „Introns late“-Kontroverse	123
6 Zusammenfassung.....	126
7 Literatur	132
Anhang A: Primer	146
Anhang B: Nukleotidsequenzen.....	147
Anhang C: Genkarten von pCR2.1 und pTZ19R	149
Danksagung	151
Versicherung	152

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung des Drei-Domänen-Modells	14
Abb. 1.2	Prozesse der zellulären toxischen Wirkung	16
Abb. 1.3.	Organisation des Pathogenitätslokus und seiner Umgebung	20
Abb. 1.4	RNA-Sekundärstruktur von Gruppe-I und Gruppe-II Introns	27
Abb. 1.5	Sekundärstruktur des Introns Cd/st1	34
Abb. 1.6	Vergleich der Transposasen von Cd/st1 und IS8301	36
Abb. 1.7	Vergleich von Cd/st1 mit anderen Gruppe-I-Introns	40
Abb. 1.8	Das P1-Pairing von Cd/st1	43
Abb. 1.9	Schematische Darstellung der IStron-Varianten CdISt1 Typen 0 bis III	46
Tab. 3.1	Stammlösung und Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika bei <i>E.-coli</i> und <i>L.-innocua</i> -Kulturen	53
Abb.4.1	Schematische Darstellung der IStron Varianten CdISt1-Typen 0 bis III	69
Abb.4.2	Sekundärstrukturen des Zielkonstrukts	73
Abb. 4.3	HindIII Restriktion der pCR2.1-TOPO-CdISt1a-Typ0-o.Stop-P2/ P9.1-NcoI Konstrukte	74
Abb.4.4	Nachweis des Spleißens pCR2.1-TOPO-CdISt1a-Typ0-o.Stop-P2/ P9.1-NcoI Konstrukte	75
Abb. 4.5	In pCR2.1 klonierte RT-PCR Produkte	76
Abb.4.6	Darstellung und Kontrollverdaus des MCS-TOPO-Konstrukts mit integriertem IStron	79
Abb. 4.7	Nachweis der erfolgreichen IStron-Integration im Plasmid pMO1	80
Abb. 4.8	Mobilisierung des catP-Gens aus pUC-P9.1/neg. catP durch NcoI-Restriktion	81
Abb. 4.9	Abb. 4.9 PCR-Nachweis der Integration des catP-Gens in pMO-1/-1(-)	82
Abb. 4.10	pMO mit catP-Gen in P9.1-Loop oder P2-Loop	83
Abb. 4.11	Anpassung des p23-Promotors im Plasmid pLATO-rep-p23	85
Abb. 4.12	Amplifizierung des p23-Promotors mit Hilfe der Primer Sall-p23 und p23-XbaI	86
Abb. 4.13	Nachweis des einklonierten Sall-p23-XbaI Promotors	87
Abb. 4.14	Spleißreaktion des IStrons mit catP-Gen integrierten P2- oder P9.1-Loop	88
Abb. 4.15	TA-Cloning und Sequenzieren der Spleißprodukte zur Verifizierung der Spleißaktivität	89
Abb. 4.16	Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Schritte zur Deletion des TlpA- und TlpB-Anteils	91
Abb. 4.17	Teilfragmente MP1 und MP2	92

Abb. 4.18	Typ III - Varianten der p23-IStrom-P2catP(+/-) und p23-IStrom-P9.1catP(+/-) Konstrukte	92
Abb. 4.19	Schematische Darstellung der generierten Konstrukte	94
Abb. 4.20	Suizidplasmid pAUL-A	95
Abb. 4.21	Schematische Darstellung der Integrationsstelle des IStrom-Konstrukts	96
Abb. 4.22	Schematische Darstellung des Transfers von pMobilität4 in <i>L. innocua</i>	97
Abb. 4.23	Transformation der pMO-4 Konstrukte in <i>L. innocua</i>	98
Abb.4.24	Inaktivierung des Chloramphenicols durch die Chloramphenicolacetyltransferase	100
Abb. 4.25	Wachstum unter Plasmid-replizierenden Bedingungen	101-102
Abb.4.26	Wachstum der Listerien mit dem Konstrukt bei 42°C	103
Abb. 4.27	Schematische Darstellung der Konstrukte mit catP in P2- bzw. P9.1-Loop des Intron Anteils	104
Abb. 4.28	Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsablaufs	105
Tab. 4.1	Wachstumskontrolle der <i>L. innocua</i> Transformaten nach 96 Stunden	106
Abb.5.1	Inaktivierung des Chloramphenicols durch die Chloramphenicolacetyltransferase	112
Abb. 5.2	Schematische Darstellung des Suizidplasmids pAUL-A	113
Abb. 5.3	Schematische Darstellung der generierten Konstrukte	116-117
Abb. 5.4	Schematische Darstellung der Integrationsstelle des IStrom-Konstrukts	117
Abb. 5.5	Schematische Darstellung der Konstrukte mit catP in P2- bzw. P9.1-Loop des Intron Anteils	119

Abkürzungen:

AAC	Antibiotika-assoziierte Kolitis
AAD	Antibiotika assoziierte Diarrhoe
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Amp	Ampicilin
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BHI	Brain Heart Infusion (Hirn-Herz-Medium)
C.	<i>Clostridium</i>
CDAD	<i>C. difficile</i> assoziierte Erkrankungen
<i>cdd1-4</i>	<i>C. difficile</i> Gene 1-4 downstream des Pathogenitätslokus
Cdd1-4	Proteine der Gene <i>cdd1-4</i>
<i>cdu1-3</i>	<i>C. difficile</i> Gene 1-3 upstream des Pathogenitätslokus
Cdu1-3	Proteine der Gene <i>cdu1-3</i>
CPE	spezifischer zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DDE	drei Aminosäuren Aspartat-Aspartat-Glutamat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Copy-DNA
CROP	Combined Repetitive Oligopeptides
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GTP	Guanosintriphosphat
IS	Insertionselement
IPx	Inositolphosphat
Kb	Kilo Basen (1000 Basen)
L.	<i>Listeria</i>
LCT	Große clostridiale Zytotoxine (large clostridial cytotoxins)
mRNA	Messenger-RNA
nt	Nukleotide
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMC	pseudomembranöse Kolitis
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotide

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCT	reverse Transkriptase PCR
ssDNA	einzelsträngige DNA (Single Strand DNA)
<i>T.</i>	<i>Tetrahymena</i>
<i>TcdA</i>	Gen des Toxin A aus <i>Clostridium difficile</i>
TcdA	Toxin A aus <i>Clostridium difficile</i>
TcdB	Toxin B aus <i>Clostridium difficile</i>
TcsH	Hämorrhagisches Toxin aus <i>C. sordellii</i>
TcsL	Letales Toxin aus <i>C. sordellii</i>
<i>tlpA</i>	Gen des Transposase-like Protein A
TlpA	Transposase-like Protein A
<i>tlpB</i>	Gen des Transposase-like Protein B
TlpB	Transposase-like Protein B
TpeL	Toxin C aus <i>C. perfringens</i>
tRNA	Transfer-RNA
T-ori	temperatursensitiven Replikationsursprung
ÜN	über Nacht

1 Einleitung

1.1 *Clostridium difficile*

1.1.1 Clostridien

Clostridien sind obligat anaerobe, grampositive, stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der Bacteriaceae. Sie bilden thermoresistente Endosporen und können sich, mit Ausnahme von *C. perfringens*, aktiv durch ihre peritriche Begeißelung bewegen. Diese Gattung zeichnet sich auch durch ihren ausgeprägten Gärungsstoffwechsel aus, der, hinsichtlich der Substratverwertung, die Clostridien in drei Gruppen unterteilt: saccharolytische, peptolytische und Harnsäurespaltende Clostridien. Clostridien kommen ubiquitär vor allem im Erdboden, aber auch in Abwässern, Tierkadavern und im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren vor [1]. Eine Reihe von Clostridien erzeugen beim Menschen lebensbedrohliche Erkrankungen. Hier sind vor allem *C. tetani*, der Erreger des Tetanus (Wundstarrkrampf), *C. botulinum* und *C. perfringens*, die meist über ihre Toxine Nahrungsmittelvergiftungen hervorrufen, sowie die gefürchteten Gasbranderreger *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum* und *C. sordellii* zu nennen. Die durch *C. difficile* verursachten Antibiotikaassoziierten Durchfälle (AAD) und pseudomembranöse Kolitis (PMC) stellen schwerwiegende nosokomiale Probleme nach Antibiotikatherapien dar, deren Kosten durch intensive Betreuung und verlängerte Krankenhausaufenthalte in Europa bis zu 3 Milliarden Euro/Jahr verursachen [2,3].

1.1.2 *Clostridium difficile* als Krankheitserreger

C. difficile kommt praktisch ubiquitär vor [4] und kann in der Darmflora von Säugetieren und Menschen sowie im Boden und in Abwässern isoliert werden [5]. Das klinische Bild der durch *C. difficile* verursachten pseudomembranösen Kolitis (PMC) wurde erstmals 1893 beschrieben [6]. Die Erstisolation beim Menschen gelang 1935 aus gesunden Säuglingen [7]. Danach dauerte es jedoch sehr lange, bis der Zusammenhang zwischen der PMC und der Infektion mit *C. difficile* hergestellt werden

konnte. Die zu Beginn der Erregersuche angenommene virale Ursache konnte nicht bestätigt werden. Erst die Suche nach bakteriellen Toxinen führte zum Erfolg [8, 9, 10]. Die biologische Aktivität von toxischen Produkten in den Stuhlproben konnte durch Antiserum gegen *C. sordellii* neutralisiert werden. Die nachfolgende Suche nach *C. sordellii* führte letztlich zur Identifizierung von *C. difficile* als Auslöser der PMC. Seither wird *C. difficile* unter die humanpathogenen Keime eingeordnet und ist als Auslöser der PMC identifiziert [8, 11]. Das Enterotoxin TcdA und das Zytotoxin TcdB sind seine beiden Hauptpathogenitätsfaktoren [12].

1.1.3 *C. difficile* assoziierte Erkrankungen (CDAD)

C. difficile wurde 1977 als einer der Haupterreger der antibiotikaassoziierten Kolitis (AAC) entdeckt [8]. Die leicht verlaufende Form der Erkrankung ist die antibiotikaassoziierte Diarrhoe (AAD), deren Häufigkeit bereits mit der Einführung der ersten Antibiotikatherapien in den vierziger Jahren zugenommen hatte [14]. Das Vollbild der fulminant verlaufenden Infektion mit *C. difficile* ist die pseudomembranöse Kolitis (PMC), die retrospektiv vor der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts bereits als Komplikation nach schweren chirurgischen Eingriffen aufgetreten war [13]. Mit der Einführung von Lincomycin und Clindamycin entwickelten sich Durchfälle zu einem bedeutenden klinischen Problem [16, 17, 18]. Insbesondere bei Patienten, die in der Chirurgie mit Clindamycin therapiert wurden, traten *C.-difficile*-assoziierte Erkrankungen (CDAD) gehäuft auf [15]. Fehlt bei ambulant erworbenen CDAD-Fällen in einem erheblichen Prozentsatz die entsprechende Antibiotika-Anamnese [19], so ist der Zusammenhang von nosokomial erworbenen *C.-difficile*-assoziierten Erkrankungen mit Antibiotikatherapie heute gut belegt [19,20]. Die *C.-difficile*-assoziierte Diarrhoe ist heute die häufigste nosokomial erworbene gastrointestinale Erkrankung und stellt wegen der zunehmenden Schweregrade der Erkrankungen und besonders wegen der Neigung zu Rezidiven in vielen Kliniken ein bedeutendes Problem dar [20, 21, 22, 23, 24, 25]. Nach Studien der letzten Jahre werden 11-13% der Fälle von AAD und 50 – 75% von antibiotikaassoziiierter Kolitis (AAC) sowie über 90% von PMC durch *C. difficile* ausgelöst [18, 19, 20, 27]. Die Letalität der CDAD beträgt 1 bis 2%, steigt jedoch auf 6 – 30% im Falle der Entwicklung einer pseudomembranösen Kolitis [19, 28]. Die Besiedlungsrate der gesunden Bevölkerung

mit *C. difficile* ist altersabhängig. So wird der Besiedlungsstatus von Neugeborenen mit bis zu 67% (bei Krankenhausgeburten) angegeben, wobei es sich gewöhnlich um eine asymptomatische Besiedlung handelt [5, 29, 30, 31]. Bei Kindern unter 2 Jahren beträgt die Prävalenz der *C.-difficile*-Besiedlung noch bis zu 62%, bei etwas höherer Erkrankungsrate als bei Neugeborenen. Kinder über 2 Jahre zeigen mit einer Prävalenz von 2 – 8% ähnliche Besiedlungsraten wie Erwachsene [29,30]. Man vermutet, dass die Entwicklung der normalen intestinalen Flora im Kindesalter einen inhibierenden Effekt auf die *C.-difficile*-Besiedlung ausübt. Für die geringere Erkrankungshäufigkeit trotz der hohen Besiedlungsrate bei gesunden Neugeborenen werden verschiedene Erklärungen vorgeschlagen. So wird vermutet, dass die intestinalen Toxin-Rezeptoren bei Neonaten wegen Unreife der Darmenterozyten noch nicht ausgebildet oder diese maskiert und für die pathogenetisch bedeutsamen Toxine nicht zugänglich sind. Strenge Beweise hierfür stehen jedoch noch aus [32, 33, 34, 43]. Zusätzlich werden sowohl mütterliche Antikörper als auch die Unreife des kindlichen Immunsystems für das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion, aber auch diätetische Einflüsse diskutiert [30, 35, 36, 37, 38,].

C. difficile wird meist als Schmierinfektion über den fäkal-oralen Übertragungsweg erworben [18]. Die Fähigkeit zur Ausbildung von extrem überlebensfähigen, gegen Hitze, Desinfektionsmittel und anderen Umweltfaktoren resistenten Sporen erleichtert die Persistenz des Erregers insbesondere im Krankenhaus. *C. difficile* ist eine der bedeutsamsten nosokomialen Infektionserreger, jeder Aufenthalt im Krankenhaus stellt einen Risikofaktor für die Besiedlung (und nachfolgende Infektion) mit *C. difficile* dar [19, 20, 28, 39, 40, 41].

Dank einer intakten Mikroflora des Darms sind gesunde Erwachsene relativ resistent gegenüber einer Kolonisation und Infektion mit *C. difficile*. Diese sogenannte Kolonisationsresistenz wird durch Antibiose geschwächt oder geschädigt, es resultiert eine Dysbiose der Darmflora und daraus ein Selektionsvorteil von *C. difficile* [42]. Ein hohes Erkrankungsrisiko besteht insbesondere bei Behandlung mit Clindamycin, Lincomycin, Cephalosporine der zweiten und dritten Generation sowie mit Ampicillin und Amoxycillin [18, 30]. Weitere Risikofaktoren sind Hospitalisation, höheres Alter, Immunschwäche, Bestrahlung, gastrointestinale Vorerkrankungen oder Operationen des GIT [18, 30].

Klinische Manifestationen der Erkrankung reichen von einer leichten Diarrhoe bis hin zur schweren pseudomembranösen Kolitis, bei der explosive, wässrige Durchfälle auftreten. In diesem Fall enthält der Stuhl häufig blutige, eitrige oder schleimige Beimengungen. An der Darmwand finden sich Pseudomembranen, die aus Fibrin, Schleim, nekrotischen Epithelzellen und Leukozyten bestehen. Die Erkrankung geht bei solch schweren Verlaufsformen häufig mit Fieber, krampfartigen Schmerzen und Übelkeit einher. Je nach Schweregrad der Durchfälle kann es zur Dehydratation, Elektrolytentgleisung oder Hypoproteinämie kommen. Gefürchtete Komplikationen mit signifikant erhöhter Letalität sind das toxische Megakolon und die häufig zur Sepsis führende Darmperforation [44]. Die zuerst eingesetzte Behandlungsform *C.-difficile*-assoziierter Erkrankungen (CDAD) ist die orale Gabe von Metronidazol über 10 bis 14 Tage [45, 46]. In schweren Fällen wird Vancomycin bevorzugt, so etwa während der Schwangerschaft und Stillperiode, bei Intoleranz auf Metronidazol und bei Persistenz der Symptome nach 3-4 Tagen Metronidazol-Behandlung. Als Nachteil der Vancomycin-Therapie wird oft die Gefahr von Infektionen mit, oder aber die Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken angesehen [47]. Da die Vancomycin-Therapie jedoch ausschließlich oral erfolgt (Vancomycin nicht resorbiert wird) und immer hoch dosiert ist, kann man entsprechende Sorgen als eher überschätzt einstufen. Ein erhebliches Problem in der Therapie der CDAD ist das hohe Risiko eines klinischen Rezidivs. Rezidive treten bei circa 20% der mit Metronidazol oder Vancomycin behandelten Patienten auf und werden dabei in knapp der Hälfte der Fälle durch einen zweiten, differenten Stamm verursacht [19]. Etwa 50-65% der Patienten, die bereits einen Rückfall erlitten haben, erleiden erneute Reinfektionen [48]. 3-5% der Fälle haben sogar mehr als 6 Rezidive [49]. Beim ersten Rezidiv erfolgt die Therapie erneut mit Metronidazol. Beim zweiten Rezidiv wird eine intermittierend ausschleichende Therapie mit Vancomycin über 7 Wochen empfohlen [50]. Zusätzlich haben mehreren Studien gezeigt, dass das Probiotikum *Saccharomyces boulardii* einen positiven Einfluss auf die Rate der Reinfektionen ausübt. Wurde bei Patienten mit einem Rezidiv, zusätzlich zu Metronidazol oder Vancomycin, *Saccharomyces boulardii* verabreicht, so konnte das Risiko weiterer Rezidive signifikant gesenkt werden [51]. Noch gibt es keine schlüssigen Beweise für den Einfluss von *Saccharomyces boulardii* auf die Pathogenese der *C.-difficile*-Infektion. Die Wirkung einer von *S. boulardii* produzierten Serinprotease, welche die *C.-difficile*-Toxine A

(TcdA) und B (TcdB) proteolytisch spaltet [52], wurde ebenso wie der Einfluss von Endoglycosidasen auf Rezeptoren vorgeschlagen.

In den letzten Jahren berichteten verschiedene Länder über einen starken Anstieg der CDAD-Fallzahlen. In den USA haben sich die Patientenzahlen mit dieser Entlassungsdiagnose im Zeitraum von 1996 bis 2003 nahezu verdoppelt [53]. Auch ambulant erworbene CDAD-Fälle nehmen scheinbar zu [54]. Dies kann zum Teil auf die zunehmende Verbreitung eines neuen, hochvirulenten *C.-difficile*-Stamms zurückzuführen sein [53, 55].

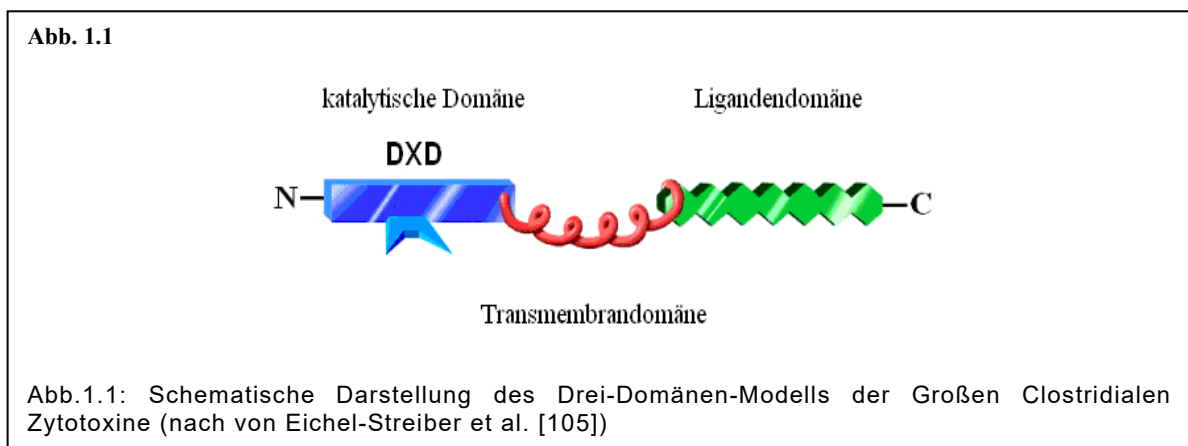
1.2 Große clostridiale Zytotoxine (LCTs)

Die beiden von *C. difficile* gebildeten Toxine TcdA und TcdB sind die entscheidenden Virulenzfaktoren für die Antibiotikaassoziierte Diarrhoe und die pseudomembranöse Kolitis. Sie gehören zur Gruppe der großen clostridialen Zytotoxine (LCTs). Zu den LCTs gehören neben den *C.-difficile*-Toxinen TcdA und TcdB, auch das letale (TcsL) und hämorrhagische (TcsH) Toxin von *C. sordellii*, das α -Toxin (Tcn α) von *C. novyi* [56] und das TpeL-Toxin von *C. perfringens* Typ C [57]. Die LCTs sind die größten, bislang bekannten, einkettigen bakteriellen Toxine. Die beiden Toxine TcdA und TcdB sind Monomere, haben ähnliche Aminosäuresequenz und Struktur (63% ihrer Aminosäuren sind homolog) [58].

1.2.1 Molekularer Aufbau von TcdA und TcdB

Die LCTs lassen sich strukturell in einem C-terminalen, repetitiven Anteil und einem N-terminalen, nicht repetitiven Anteil unterteilen. Funktionell ließe sich ein Drei-Domänen-Modell etablieren, dass die LCTs in eine Ligandendomäne, eine Transmembrandomäne und in eine katalytische Domäne unterteilt (**Abb.1.1**). Die Ligandendomäne befindet sich am C-terminalen Ende und baut sich aus einer repetitiven Abfolge kurzer Oligopeptide (20-50 AS) (Combined Repetitive OligoPeptides, CROP) auf [65].

Es gibt Hinweise dafür, dass die CROP-Region als Ligand fungiert, für die spezifische Rezeptorbindung verantwortlich ist [66]. Die Transmembrandomäne wird im zentralen Bereich der Toxine vermutet. Dort befindet sich eine hydrophobe Region mit α -helikalen Segmenten, die lang genug sind, um eine Doppelmembran zu durchspannen [67]. Es wird angenommen, dass sie bei der Translokation des Toxins über zelluläre Wirtsmembranen beteiligt sind [68]. Die katalytische Domäne ist am N-terminalen Ende lokalisiert und macht ein Drittel des Toxins aus. Im Zentrum der katalytischen Domäne befindet sich ein hoch konserviertes Motiv (DXD), welches für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Es wird vermutet, dass das DXD-Motiv unter Einfluss von Mn^{2+} -Ionen die Bindung des CO-Substrats UDP-Glucose vermittelt [69].



1.2.2 Zelluläre Aufnahme der Clostridium difficile Toxine A und B

Viele bakterielle Exotoxine mit intrazellulären Zielstrukturen gehören zur Gruppe der AB-Toxine. Gemeinsam ist diesen eine Organisation in zwei Komponenten: einer biologisch aktiven Komponente A sowie einer Komponente B, die für die Bindung des Toxins an die Zielzelle, die Internalisierung und die Translokation der A-Komponente ins Zytosol verantwortlich ist [93]. Die strukturelle Unterteilung der AB-Toxine in zwei funktionelle Bereiche wurde bereits 1978 von Gill beschrieben [94]. Da sich viele Toxine aus mehreren A- und B-Teilen zusammensetzen, ist die heutige vollständige Bezeichnung dieser Toxine "AnBm-Toxine", wobei n und m die Anzahl der A bzw. B-Teile angeben [95].

Die *C.-difficile*-Toxine A und B sind keine klassischen A1B1-Toxine, da sie nicht aus zwei separaten Ketten bestehen. Sie werden sie über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen. Die Natur der Rezeptoren konnte bislang nicht

vollständig geklärt werden. Für TcdA konnten die Zuckerstrukturen Gal α 1-3Gal β 1-4GluNAc [96] und GalNAc β 1-3Gal β -4GluNAc [97] identifiziert werden, der verantwortliche Rezeptor im humanen Colon ist bis jetzt allerdings noch unbekannt.

Es wird davon ausgegangen, dass mehrere Zelloberflächenproteine als Rezeptoren für TcdB und TcdA dienen, einschließlich Chondroitinsulfat-Proteoglycan-4 (CSPG4, Poliovirus Rezeptor-like 3 (PVRL3) und Frizzled-1/2/7 (FZD1/2/7) für TcdB, Glycoprotein-96 (gp96) und Sucrase-Isomaltase (SI) für TcdA und LDL-Rezeptor-verwandtes Protein-1 (LRP1). Darüber hinaus wurde kürzlich vorgeschlagen, dass LRP1 auch als Zellzugangsrezeptor für TcdB dient (TcdB-Rezeptor-2). Die Frage, ob die Toxine den normalen Umsatz ihrer Rezeptoren (z. B. konstitutive Endozytose und Recycling) auf der Zelloberfläche nutzen oder ob die Toxinaktivität die Internalisierung ihrer Rezeptoren induziert, ist noch nicht geklärt worden. [98, 253-301]. Die Internalisierung der Toxine geschieht über clathrinabhängige Endozytose [86].

Nach der Endozytose werden die aufgenommenen Vesikel weiter zu Endosomen prozessiert, wobei das Innere der Vesikel durch die Aktivität der vesikulären ATPase angesäuert wird. Durch den niedrigen pH-Wert in den Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer reversiblen erhöhten Hydrophobizität führt und dem Toxin die Interaktion mit der endosomalen Membran erlaubt [100], wobei die Transmembrandomäne in die endosomale Membran inseriert [99] und die Translokation der Enzymdomäne bewirkt. Nach proteolytischer Abspaltung der Enzymdomäne (Aminosäure 1-543 von TcdB) durch seine Inositol-6-phosphat induzierte Autoprotease gelangt das katalytische Fragment (von TcdA/B) ins Zytosol [102, 103, 104]. Das entstandene 63kDa-Fragment entwickelt extrazellulär appliziert keine Zytotoxizität [102, 103]. Wird es jedoch in die Zelle injiziert, so wird der typische zytopathische Effekt von TcdA und TcdB erzeugt [103] (**Abb.1.2**).

Abb. 1.2

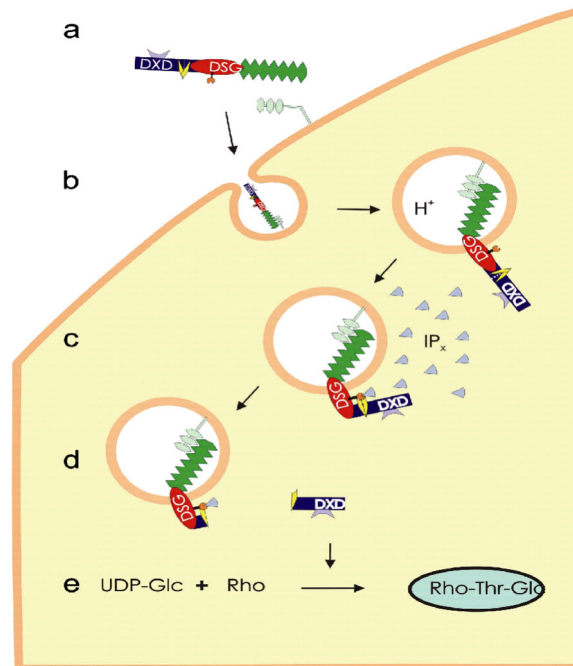


Abb.1.2:Das Schema stellt in a) bis e) die Prozesse dar, die für die zelluläre toxische Wirkung des Toxins notwendig sind:

- a) die Interaktion des Toxins mit dem spezifischen Rezeptor induziert die rezeptorvermittelte Endozytose;
 - b) die Ansäuerung in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung und Insertion des Toxins in die endosomale Membran mit Ausbildung einer Pore.
 - c) Toxin B interagiert mit Inositolphosphat (IP_x).
 - d) die intrinsische Protease katalysiert die proteolytische Spaltung und setzt das katalytische Fragment ins Zytosol frei.
 - e) Glykosylierung der GTPasen (hier Rho) durch das N-terminale 63kDa-Fragment und dem Cofaktor UDP-Glukose (UDP-Glc) mit Folge der Disaggregation des Zytoskeletts und schließlich Zelltod.
- (nach Reineke et al. 2007 [104])

1.2.3 Klassifizierung der LCTs und Darstellung der enzymatischen Aktivität

Gelangt das Toxin bzw. die katalytische A-Domäne ins Zytosol, so entfaltet sich ihre enzymatische Aktivität. Alle bekannten LCTs sind Glykosyltransferasen, die kleine GTPasen glykolisieren, wobei UDP-aktivierte Zucker als Co-Substrat dienen. Die enzymatische Aktivität besteht in der kovalenten Modifikation verschiedener kleiner G-Proteine der Ras- und Rho-Subfamilie, verbunden mit deren funktioneller Blockade [56, 70-73]. Kleine GTP-bindende Proteine sind monomere Proteine mit einer relativ geringen Molekularmasse von 20-40 kDa. Die derzeit über 100 bekannten GTPasen lassen sich aufgrund phylogenetischer Kriterien in die fünf Familien Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran unterteilen. Sie fungieren in vielen eukaryotischen Signal-

Transduktionswegen als "molekulare Schalter" und beeinflussen die Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie etwa der Genexpression (Ras/Rho/Rac/Cdc42), die Regulation des Vesikeltransports (Rab und Sar1/Arf), die Regulation des Transports zwischen Cytoplasma und Zellkern während der G1-, S1- und G2-Phase des Zellzykluses, sowie die Microtubuli-Dynamik während der M-Phase (Ran) [90, 91]. Die GTPasen durchlaufen hierbei einen Zyklus zwischen inaktiver GDP-gebundener Form und aktiver GTP-gebundener Form. Abhängig vom gebundenen Nucleotid ändern zwei variable Regionen, die als *switch*-Region bezeichnet werden, ihre Konformation. Die in der GTP-bindenden Form vorliegende Konformation der *switch*-I-Region vermittelt die Interaktion mit Effektorproteinen, die in der Signalkette nachgeschaltet sind. Die Aktivität der kleinen GTPasen wird zusätzlich über drei verschiedene Gruppen von Regulatorproteinen bestimmt. Akzessorische Proteine, so genannte „GTP exchange factors“ (GEF), katalysieren die Beladung der GTPasen mit GTP und fördern so deren Aktivierung. Die Inaktivierung geschieht durch Abspaltung des γ -Phosphats des GTPs. Da die kleinen GTPasen eine sehr geringe intrinsische GTPase-Aktivität besitzen, spielt hier eine andere Gruppe akzessorischer Proteine eine entscheidende Rolle, die „GTPase activating proteins“ (GAP). Für jeden Vertreter der Familie der LCTs sind charakteristische Substrate und Co-Substrate beschrieben. TcdA und TcdB glycolysieren spezifisch die kleinen GTPasen der Rho-Subfamilie (Rho, Rac und Cdc42). Die durch TcdA und TcdB katalysierte Monoglycolysierung findet am Threonin (35/37) in der so genannten *switch*-I-Region statt. Diese Region ist in die Interaktion mit dem Effektor involviert und daher unter den kleinen GTPasen hochkonserviert. Die Monoglycolysierung blockt somit die Bindung der Effektoren der GTPasen [72]. Auch die intrinsische und GAP-stimulierte GTPase-Aktivität wird inhibiert [92]. Da Rho-GTPasen eine wichtige Rolle bei der Regulation dynamischer Prozesse des Aktins spielen [74, 75], führt die Blockade der Signaltransduktionskette zum Zusammenbruch des Zytoskeletts der geschädigten Zellen [56]. Die Inaktivierung der kleinen G-Proteine durch die LCTs verursacht bei Kulturzellen eine morphologisch deutlich sichtbare Veränderung, die als spezifischer zytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet wird [56, 76]. Trotz des sich gleichenden katalytischen Grundprinzips üben die unterschiedlichen LCTs unterschiedliche zytopathische Effekte auf kultivierte Zellen aus. Der CPE tritt in zwei klar differenzierbaren Formen auf. Der D-Typ CPE wird von den *C.-difficile*-Toxinen TcdA und TcdB [76-79], von *C. novyi* Tc α [80, 81] und von *C. sordellii* TcsH hervorgerufen [82]. Der S-Typ CPE wird von *C. sordellii* TcsL [76, 83] und den

Varianten des TcdB von *C. difficile* erzeugt, der mit einer Inaktivierung vornehmlich von Ras-Subtyp und nicht von Rho-Subtyp-Proteinen in Verbindung gebracht wird [84, 85, 88]. Als Nebenbefund tritt bei den varianten TcdB-Trägern oft gleichzeitig eine Deletion oder eine Leserastermutation im *tcdA*-Gen auf, so dass nur eines der beiden typischen Toxine gebildet wird. Der von LCTs hervorgerufene CPE beruht auf Veränderungen in der Organisation von Komponenten des Zytoskelettes. Davon ist in erster Linie das dynamische Gleichgewicht des Prozesses der Polymerisation und Depolymerisation von Aktin betroffen, sowie die fokalen Adeshionskomplexe, die den Ansatzpunkt der Aktin-Stressfasern darstellen [56, 86, 87]. Die morphologischen Veränderungen beim D-Typ CPE zeigen sich in einem Abrunden der Zellen mit astrozytenähnlichem, sternförmigem Aussehen. Das Aktinzytoskelett kollabiert und die Aktinbausteine kondensieren um den Zellkern herum [56]. Im Gegensatz hierzu ist der S-Typ CPE charakterisiert durch das Abrunden der Zellen ohne Ausbildung von Zellausläufern. Auch hier bricht das Aktinzytoskelett zusammen, jedoch sind die Aktinmonomere in der Zellperipherie nachweisbar [56]. Diese zwei voneinander unterscheidbaren morphologischen Erscheinungsbilder werden mit der unterschiedlichen Wirkung der Toxine auf die fokalen Adhäsionskomplexe begründet [78]. Bei den S-Typ CPE-induzierenden Toxinen wird der gesamte fokale Adhäsionskomplex abgebaut und damit auch die zugehörigen Integrine, die für die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix notwendig sind [78]. Bei Toxinen, die den D-Typ CPE verursachen, ist nur ein partieller Abbau der fokalen Adhäsionskomplexe zu beobachten. Die Integrine verbleiben an dem jeweiligen Ort [78]. Der CPE eignet sich dafür, die zytotoxische Aktivität der LCTs auszutesten und gibt eine weitere, auf dem morphologischen Erscheinungsbild der Zellen basierende Einteilung der LCTs.

1.2.4 Genregulation der Toxingene *tcdA* und *tcdB*

Die Gene aller bekannten großen clostridialen Zytotoxine sind chromosomal lokalisiert. Die Toxin-kodierenden Gene *tcdA* und *tcdB* liegen zusammen mit den drei Genen *tcdC*, *tcdD* und *tcdE*, die für einen negativen und einen positiven Regulator sowie für ein Holin kodieren, in einem Bereich von 19,6kb, der als Pathogenitätsloкус (PaLoc) bezeichnet wird (**Abb.1.3**). Die Präsenz des PaLoc ist für die Pathogenität von *C. difficile*-Stämmen entscheidend. So konnte bei apathogenen, nicht toxinogenen Stämmen kein PaLoc gefunden werden [59]. Die Sequenzierung des Genoms ergab,

dass sich circa 11% der Information auf mobilen Genabschnitten befinden, wodurch genetische Veränderungen hinsichtlich Pathogenität und Wirtsanpassung erleichtert werden könnten [60]. Sowohl *tcdC* und *tcdD* als auch die Insertionssequenzen *cdu2* und *cd2-3* upstream und downstream von PaLoc scheinen für die Regulation der Toxinexpression von Bedeutung zu sein [61]. Die Expression der Toxine TcdA und TcdB wird durch einen positiven TcdR (TcdD) und einen negativen Regulator TcdC gesteuert [62, 63]. TcdD (TcdR) stellt einen Transkriptionsaktivator [62] bzw. einen σ -Faktor dar [63], der die Toxingene *tcdA*, *tcdB* und *tcdE* positiv reguliert. Bei den zu Beginn des einundzwanzigsten Jahrhunderts in Kanada, in den USA und in Großbritannien gefundenen Isolaten, die schwer verlaufende Infektionen auslösten, handelte es sich um einen Erreger mit partieller Deletion von 18 bp im *tcdC*. Diese wird als Ursache der erhöhten Virulenz angesehen und scheint eine in vitro nachweisbare gesteigerte Toxinproduktion als Folge zu haben. Solche *C.-difficile*-Stämme (Ribotyp 027, Toxinotype III und PFGE NAP1) produzieren neben den beiden Toxinen TcdA und TcdB zusätzlich das binäre Toxin CdtA/B [19, 20, 40]. TcdD ist ein basisches Protein mit einem C-terminalen Helix-turn-Helix-Motiv [62]. Die Ähnlichkeit im Promotorbereich von *tcdD* zu den entsprechenden Bereichen upstream der Toxingene anderer Bakterien lässt die Annahme zu, dass TcdD eine auf Umwelteinflüsse abgestimmte Genregulation bewirkt. Die Promotorsequenzen von *tcdA* und *tcdB* weisen Ähnlichkeiten zu den Promotorsequenzen des Bacteriocin Locus von *C. perfringens* auf, der im Rahmen einer SOS-Antwort aktiviert wird. Im Parallelschluss könnte die Expression der *C.-difficile*-Toxine TcdA und TcdB auch einer ähnlichen SOS-Antwort unterworfen sein, was auch erklären könnte, warum bei *C. difficile* eine Verbindung zwischen Toxinbildung und Sporulation festgestellt wurde [64]. Die Funktion von TcdE, dessen Gen zwischen *tcdA* und *tcdB* lokalisiert wurde, ist noch weitgehend ungeklärt. Aufgrund von Sequenzanalysen und Expressionsstudien in *E. coli* wurde eine zytolytische Funktion in der bakteriellen Zellmembran postuliert, die der von Holinen von Bakteriophagen gleicht. Da TcdA und TcdB nicht signalsequenzabhängig sezerniert werden, könnte das in der Bakterienzellmembran lokalisierte TcdE die Freisetzung von TcdA und TcdB ermöglichen [89].

Abb. 1.3

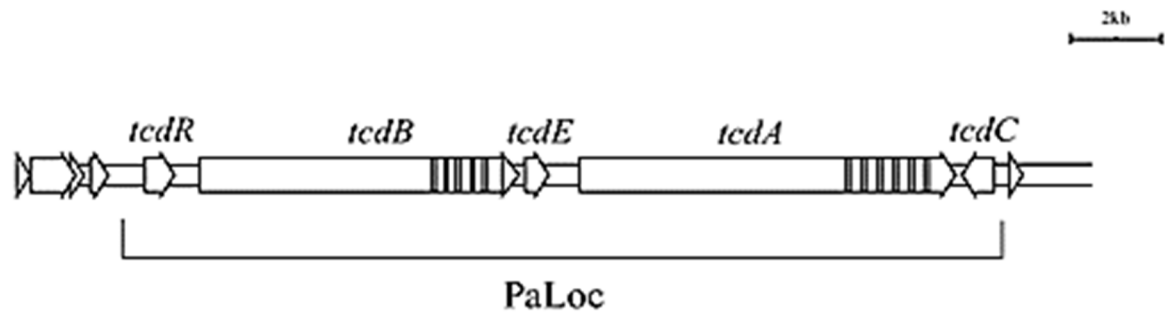


Abb.1.3: Organisation des Pathogenitätslokus und seiner Umgebung (modifiziert nach Braun et al.1996 [61])

1.3. Mobile genetische Elemente

1.3.1.IS-Elemente und Transposons als mobile genetische Elemente

IS-Elemente und Transposons werden als „springende Gene“ oder transponierbare Elemente bezeichnet, weil sie von einem Ort eines DNA-Moleküls an andere Orte des gleichen Moleküls (intramolekulare Transposition) oder von einem DNA-Molekül auf ein anderes (intermolekulare Transposition) springen können [108-111]. Transposons wurden erstmals von Barbara McClintock in *Zea mays* in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt. Arbeiten, die mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden [107]. Der Rekombinationsschritt wird durch Transposasen katalysiert, deren Gene auf dem springenden Element selbst kodiert sind [112,113]. Transponierbare Elemente sind in der Regel nicht abhängig von einer bestimmten Sequenz in der Zielstruktur [109, 114, 115]. Generell unterscheidet man transposable Elemente zunächst danach, ob die Transposition über ein RNA-Zwischenstadium verläuft oder ob ausschließlich DNA-Intermediate vorkommen. Je nach Transpositionsmechanismus teilt man die transposablen Elemente in zwei große Klassen ein: Retrotransposons (Klasse-I-Elemente) und DNA-Transposons (Klasse-II-Elemente). Die strukturell sehr heterogene Klasse der DNA-Transposons integriert nach einem „cut-and-paste“-Mechanismus. Das Transposon wird mit Hilfe einer Transposase als Fragment aus seinem Ursprungsort herausgeschnitten und an anderer Stelle wieder integriert. Die Gesamtzahl mobiler genetischer Elemente im Genom bleibt dabei konstant. Im

Gegensatz zu DNA-Transposons vermehren sich Retrotransposons bei jedem Transpositionereignis, da sie nach einem „copy-and-paste“-Mechanismus integrieren [129]. DNA-Elemente (Transposons und Insertionssequenzen) treten in allen Domänen auf, während Retroviren und Retrotransposons, die RNA-Intermediate zur Transposition nutzen, auf Eukaryoten beschränkt sind [128].

1.3.1.1. Insertionselemente

Insertionselemente wurden erstmals 1972 von Starlinger und Saedler beschrieben [106]. Bei der Untersuchung von *E.-coli*-Mutanten wurden Insertionssequenzen (IS-Elemente) im Galactose-Operon charakterisiert [106], die sich nachfolgend als typische Bestandteile des Bakteriengenoms herausstellten. Insertionssequenzen stellen den einfachsten und vermutlich auch häufigsten Typ von transposablen DNA-Elementen dar. Derzeit sind über 600 bakterielle IS-Elemente bekannt, die mehr als 17 IS-Familien zugeordnet werden [130]. IS-Elemente bestehen i.d.R. aus 800-2000 Basenpaaren. An ihren Enden tragen IS-Elemente kurze, gegenläufige Sequenzwiederholungen, die als „inverted repeats“ bezeichnet werden und als Erkennungssequenz für die eigenen Transpositionsenzyme benötigt werden. IS-Elemente sind genetisch kompakt. Im zentralen Bereich der IS-Elemente werden ausschließlich Proteine kodiert, die für ihre Mobilität verantwortlich sind. Diese Proteine werden als Transposasen bezeichnet und zumeist von einem, vereinzelt auch von zweien, offenen Leserastern kodiert. Die Insertion von IS-Elementen kann zur Unterbrechung von Strukturgenen oder starken polaren Effekten führen. Gelegentlich hat die Insertion eines IS-Elementes upstream eines Gens die Aktivierung der Expression des Gens zur Folge. Gleichzeitig wird in der unmittelbaren Nachbarschaft von IS-Elementen die Bildung von Deletionen stimuliert. Eine Reversion zum ursprünglichen Phänotyp wurde nach inexakter Exzision dieser Elemente beobachtet [118]. Doch auch als Substrat für das homologe Rekombinationssystem der Bakterienzellen sind IS-Elemente für die Entstehung von Deletionen [119], Inversionen [120], Kointegratbildung und anschließender Replikonfusion von Bedeutung [121]. Die in F- und R-Plasmiden nachgewiesenen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen, die später als IS1, IS2, IS3 und Tn1000 identifiziert wurden, sind durch ihre Beteiligung an Rekombinationsereignissen für massive DNA-Umstrukturierungen verantwortlich [122, 123]. Die Abschnitte, die zwischen einem Paar rekombinierender IS-Elemente liegen,

können invertiert, deletiert, inseriert oder verdoppelt werden. Deletionen oder Inversionen finden in diesem Bereich um den Faktor 2-3 häufiger statt. Außerdem können Promotorelemente im IS-Element selbst die Expression von benachbarten Genen bewirken [115, 124]. IS-Elemente beeinflussen auf diese Weise die genetische Variabilität der betroffenen Wirte und können als Promotoren einer schnelleren Anpassung an veränderte Umweltbedingungen angesehen werden [125]. Damit verleihen IS-Elemente ihrem Wirt einen Selektionsvorteil, der allerdings nicht immer so offensichtlich (weil direkt) ist, wie z.B. bei der Übertragung von Antibiotikaresistenzen über Transposons. IS-Elemente ermöglichen über „Makromutation“ Evolutionssprünge [126].

1.3.1.2 Transposons

Transposons sind bedeutend größer als IS-Elemente und enthalten im Gegensatz zu IS-Elementen neben den für die Mobilität verantwortlichen Genen noch zusätzliche Gene. Diese können z.B. Antibiotika- oder Schwermetall-Resistenzgene sein, für die sie in ihrer zentralen Sequenz kodieren [113, 116]. Transposons werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse-I-Transposons sind von IS-Elementen eingerahmt, die über Transposasen die Mobilität des genetischen Elements vermitteln. Klasse-II-Transposons weisen an ihren Enden „inverted repeats“ auf, die Transpositionsproteine werden vom Transposon selbst kodiert. Die Frequenz der Transposition von Transposons oder auch IS-Elementen wird durch die jeweilige Konzentration der Transposase in der Zelle bestimmt. Springen diese Elemente zu häufig, kann dies für die Zelle letale Auswirkungen haben, da das Springen zu Mutationen führen kann. Die Kontrolle der Genexpression der Transposase ist deshalb für die Zelle von großer Bedeutung. Beide Klassen der Transposons unterscheiden sich in der Art der Transposition. Klasse-I-Transposons transponieren nicht-replikativ, auch konservativ genannt [109]. Nach der Transposition ist das transponierbare Element nur in der Empfänger-DNA, nicht aber in der Donor-DNA vorhanden. Klasse-II-Transposons werden erst repliziert und anschließend wird eines der Replikationsprodukte auf das Empfängergenom übertragen. Während der Transposition ist das Element sowohl in der Donor-DNA als auch in der Empfänger-DNA vorhanden. Diese replikative,

intermolekulare Transposition führt zu Co-Integraten, die entweder durch Resolvasen oder durch homologe Rekombination wieder aufgelöst werden [109]. Transposons sind in der Lage, Antibiotikaresistenzen anzusammeln und zu exprimieren. Sie sind damit an der Bahnung von Resistenzmechanismen, auch durch horizontalen Gentransfer, beteiligt [117]. Übertragung von Mehrfachresistenzen durch Transposons ist üblich [113, 114]. Bestimmte Loci im Wirtsgenom (hotspots of recombination) scheinen für die Aufnahme neuer Gene (wie z.B. Transposons) bevorzugt zu werden.

1.3.1.3. Transpositionsmechanismen

Die Transposasen katalysieren die Rekombinationsschritte. Ihre größte Untergruppe ist die Klasse der DDE-Transposasen (wobei DDE für drei Aminosäuren Aspartat-Aspartat-Glutamat steht). Eine fundamentale Gemeinsamkeit dieser Klasse von Transposasen ist die von ihnen katalysierte Reaktion: der nukleophile Angriff eines der zwei DNA-Stränge am Ende des IS-Elements, der zur Entstehung eines freien 3'-OH-Endes führt. Die Mehrzahl der IS-Elemente besitzt an ihren Enden kurze „inverted repeat“(IR)-Sequenzen. Diese IRs lassen sich in zwei funktionelle Bereiche unterteilen: in einen inneren Bereich, der an der Erkennung und Bindung der Transposase beteiligt ist, und in einen äußeren, der die terminalen 2 oder 3 bp umfasst und für die katalytische Spaltung der DNA und den folgenden Strangtransfer benötigt wird [132]. Die eigentliche Transpositionsreaktion wird in mehrere Schritte unterteilt. Nach der Bindung der Transposase an die Enden des Transposons wird ein „synaptischer Komplex“ gebildet, bestehend aus Transposase, eventuell zusätzlichen Proteinen, und beiden Transposon-Enden. Gleichzeitig oder nachfolgend wird die Ziel-DNA rekrutiert, gefolgt von der DNA-Hydrolyse und dem Strangtransfer der Transposon-Enden zur Ziel-DNA unter Prozessierung des Strangtransfer-Intermediats zum Endprodukt. Die für diese Schritte notwendigen DNA-Protein-Komplexe werden auch als Transpososom bezeichnet [131, 132].

Alle DDE-Transposasen katalysieren die Spaltung der DNA am 3'-Ende des Elements. Dies erfolgt durch einen nukleophilen Angriff, in der Regel von einem Wassermolekül ausgehend, und führt zur Freisetzung einer 3'-OH-Gruppe, die wiederum selber als nukleophil wirkt und in einer Transveresterungsreaktion eine 5'-Phosphatgruppe der Ziel-DNA angreift. Diese Reaktion benötigt keine zusätzliche Energie, es bildet sich

keine kovalente Bindung zwischen Enzym und Substrat aus. Die Funktion der hoch konservierten Aminosäuretriade Aspartat-Aspartat-Glutamat (DDE) besteht darin, in einer „katalytischen Tasche“ zwei divalente Metallionen (meist Mg^{2+}) zu koordinieren. Diese werden für die Katalyse der verschiedenen nukleophilen Angriffe benötigt. Der Abstand zwischen der zweiten Asparginsäure (D) und der Glutaminsäure (E) beträgt oftmals 35 Aminosäuren [145], dieses exakte Spacing ist aber keine Grundvoraussetzung für die Koordination eines Mg^{2+} -Ions. Anderes Spacing ist möglich, bei der Transposase von Tn10 beträgt der Abstand der beiden Reste 131 Aminosäuren [146], bei IS903 sind es 66 Aminosäuren [147]. Für die IS911-kodierte Transposase wurde gezeigt, dass das DDE-Motiv innerhalb einer Protein-Interaktionsdomäne liegt [148]. Unter den Transpositionsreaktionen werden generell zwei Typen unterschieden. Bei der einen Reaktion bleibt das Transposon an das DNA-Donormolekül gebunden, bei der anderen wird es ausgeschnitten.

Im ersten Fall wird nur das 3'-Ende geschnitten und das Donor-DNA-Rückgrat bleibt einzelsträngig an das 5'-Ende des Transposons gebunden. Durch Transfer des 3'-Endes auf eine Zielsequenz entsteht eine potentielle Replikationsgabel. Auf diese Weise entstehen Kointegrate (Fusionen) aus Donor- und Zielsequenz. Dieser replikative Weg wird z.B. vom Bakteriophagen Mu und höchstwahrscheinlich von Elementen der Tn3- und IS6-Familien genutzt [131]. Beim zweiten Typ von Transposition wird das Transposon vor dem Strangtransfer aus der Donor-DNA freigesetzt. Dieser so genannte „Cut-and-paste“-Mechanismus trifft z.B. für Tn7 [133], IS10 [134], IS50 [149] und Elemente der IS3-Familie wie IS911 [135] zu. Obwohl all diesen Elementen als erster Schritt die Erzeugung eines freien 3'-OH-Endes durch Hydrolyse des ersten DNA-Stranges gemeinsam ist, nutzen sie doch unterschiedliche Mechanismen zur Auflösung des zweiten Stranges und der Erzeugung eines freien 5'-Endes [131]. Es gibt drei Strategien, nach denen bakterielle IS-Elemente dieses Typs die Freisetzung des 5'-Endes erreichen: Erstens (I) durch Spaltung des transferierten und des nicht transferierten Stranges durch zwei Enzyme. Wenn gleichzeitig mit den 3'-Enden auch die 5'-Enden geschnitten werden, wird das Transposon komplett aus der Donorsequenz freigesetzt und kann nachfolgend in eine Ziel-DNA inseriert werden. Tn7 nutzt für diese einfache Insertionsstrategie neben der DDE-Transposase TnsA ein zweites Enzym, TnsB, das für die Spaltung der 5'-Enden verantwortlich ist [133].

Zweitens (II) über Haarnadelbildung, wobei in einem alternativen Mechanismus, z.B. bei IS10 und IS5, eine einzige Transposase die Spaltung des Doppelstrangs katalysieren kann [136, 137]. Dabei greift das im ersten Schritt entstandene freie 3'-OH genau gegenüber am komplementären DNA-Strang an. Dies führt zu einem Doppelstrangbruch der Donor-DNA und der Ausbildung einer Haarnadelstruktur am Transposonende. Das Element wird aus der Donor-DNA freigesetzt. Schließlich kann die Einzelstrangbrücke wieder aufgelöst werden und der Transfer in die Ziel-DNA erfolgen [132]. Und schließlich ist die Zirkelbildung der dritte Mechanismus (III) der Freisetzung des 5'-Endes. Dabei greift die freie 3'-OH-Gruppe das 5'-Ende des Elementes auf demselben Strang an. Die so entstehenden Intermediate werden anschließend unter Beteiligung von Wirtsenzymen zu freien Transposonzirkeln prozessiert und können im Anschluss wieder in eine Ziel-Sequenz integrieren. Dieser Mechanismus wurde besonders gut bei IS911, einem Element der IS3-Familie, charakterisiert; tritt aber auch bei IS-Elementen anderer Familien wie z.B. IS256 auf [138-143]. Da im Falle von IS911 nur ein DNA-Strang ausgeschnitten und repliziert wird, während der zweite in die Donor-DNA inseriert bleibt, spricht man in diesem Fall ebenfalls von einem „copy-and-paste“ Mechanismus [144].

1.3.2. Introns

Introns sind mobile, genetische Elemente, die sich grundlegend von IS-Elementen und Transposons unterscheiden. Führt die Integration eines IS-Elements oder eines Transposons in ein Gen mit großer Wahrscheinlichkeit zu dessen Inaktivierung, so ist die Integration eines Introns mit weitaus weniger Konsequenzen verbunden. Der DNA-Abschnitt mit dem Intron wird zwar transkribiert, das Intron wird jedoch nachfolgend durch einen als „Spleißen“ bezeichneten Prozess ausgeschnitten und fehlt damit in der funktionellen mRNA [31, 32]. Auf diese Weise ist die Translation zu einem funktionellen Protein trotz Integration eines Introns in das entsprechende Gen möglich. Der Spleißvorgang findet immer auf Ebene der RNA statt. Manche RNA-Moleküle mit definierten Sekundärstrukturfaltungen besitzen eine katalytische Aktivität und spleißen bei in-vitro-Versuchen ohne Beteiligung von Proteinen. Dieses autokatalytische Spleißen wird auch als Selbstspleißen bezeichnet und ist charakteristisch für Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns [31-33]. Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns werden daher auch als Ribozyme klassifiziert; in Anlehnung an die katalytische Aktivität von Enzymen.

1.3.2.1. Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns

Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns sind phylogenetisch sehr weit verbreitet und mit einer großen Verteilungsvielfalt im Genom versehen [31, 35]. Dies zeigt auf, dass Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns verschiedene, effiziente Mechanismen zu ihrer Verbreitung entwickelt haben müssen. Die Mobilität von Gruppe-I-Introns wird beispielsweise mit der Aktivität intronkodierter Endonukleasen, sogenannter „Homing Endonukleasen“, korreliert [31, 32, 36, 37]. Für Gruppe-II-Introns sind Reverse-Transkriptase-ähnliche Proteine beschrieben worden, die ebenfalls intronkodiert sind und die Mobilität dieser Introns entsprechend vermitteln [31, 32, 36]. Eine charakteristische Eigenschaft von Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns ist ihre autokatalytische Aktivität, die zur in-vitro-Selbstsplicingreaktion befähigt, bei der sich das Intron aus der Vorläufer-mRNA ausschneidet. Damit verbunden ist die gleichzeitige Verknüpfung der Exonsequenzen. Das Intron fehlt damit in der funktionellen mRNA [31-34].

Ein Gruppe-II-Intron in *C. difficile* konnte von der Arbeitsgruppe um P. Mullany im Jahre 1996 erstmals nachgewiesen werden [29]. Mit CdiSt1 konnte im Jahre 2000 ein Gruppe-I-Intron im eubakteriellen Gen nachgewiesen werden [185]. In Eubakterien gefundene Gruppe-I-Introns waren ausschließlich in der Antikodonschleife von tRNA-Genen lokalisiert worden [40-44]. Gruppe-I-Introns wurden zuvor häufig in mitochondrialer DNA von Pilzen und Pflanzen, in rRNA-Genen von niederen Eukaryonten wie Tetrahymena, in Chloroplasten-DNA und in Bakteriophagen nachgewiesen [39-51].

Abb. 1.4

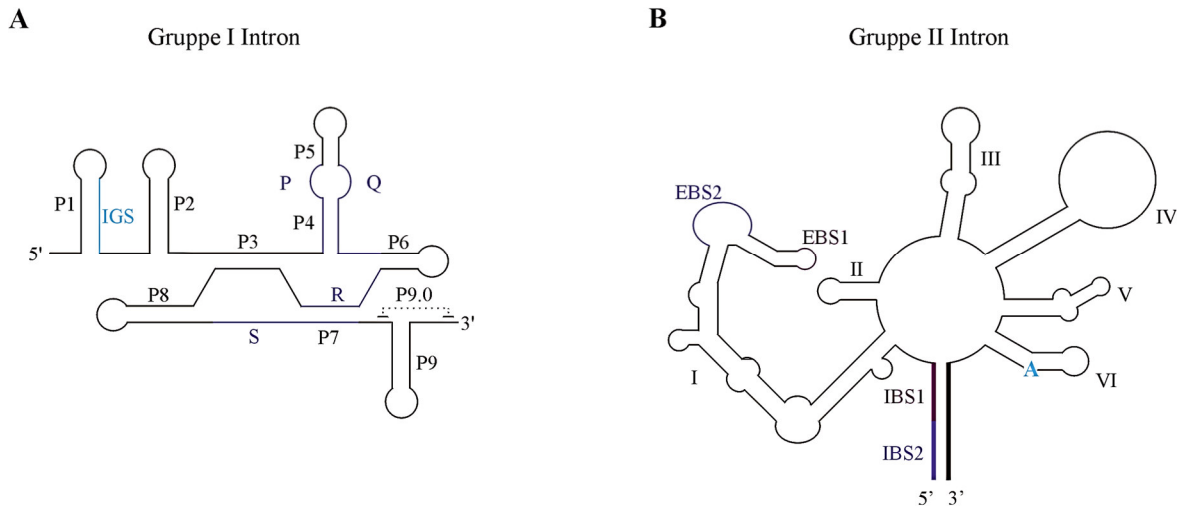


Abb.1.4 RNA-Sekundärstruktur von Gruppe-I und Gruppe-II-Introns (modifiziert nach [157]).

A: Beispielskizze eines Gruppe-I-Introns. 5'- und 3'-Exon sind grün eingezeichnet, die Internal Guide Sequence (IGS) blau. Die P-, Q-, R- und S-Sequenzen sind lila dargestellt, die 5'- und 3'-Spleißstellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das mit dem 3'-Exon gebildete P10-Pairing ist nicht dargestellt; weitere Details siehe Text. B: Darstellung eines Gruppe-II-Introns. Die dem 5'-Exon zugehörigen Sequenzabschnitte "Intron Binding Site 1" (IBS1) und "Intron Binding Site 2" (IBS2) sind in der gleichen Farbe wie ihr jeweiliger Bindungspartner im Intron, die "Exon Binding Site 1" (EBS1) und die "Exon Binding Site 2" (EBS2), abgebildet; das 3'-Exon ist grün eingezeichnet, die Spleißstellen sind mit einem Pfeil markiert. Die Domäne I ist oftmals komplexer ausgebildet, als hier gezeigt; für weitere Details siehe Text (nach Mehling et al).

1.3.2.2. Spleißmechanismus und Aufbau von Gruppe-I-Introns

Der Spleißmechanismus vollzieht sich auf Ebene der RNA in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungsreaktionen von Phosphodiesterbindungen [31-33]. Für den Spleißvorgang sind lediglich Mg^{2+} -Kationen und ein externes Guanotin notwendig. Initiiert wird die Spleißreaktion von einem nukleophilen Angriff des Guanotins auf die Phosphatgruppe der 5'-Spleißstelle. Über zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungen erfolgt dann die Exzision des Introns und die Ligation des 5'- und 3'-Exons. Das Lösen und das Verknüpfen der Bindungen sind miteinander gekoppelt, es wird keine zusätzliche Energie für die Reaktion benötigt, die dementsprechend auch vollständig reversibel ist. Gruppe-I-Introns können über eine zusätzliche Transesterifizierung nach ihrer Exzision zyklisieren [31-33]. Mit dieser Reaktion wird möglicherweise das Gleichgewicht der Spleißreaktion hin zu den gespleißten Produkten verlagert [32]. Es konnte gezeigt werden, dass sich auch CdiSt1 spezifisch und effizient aus der mRNA herausspleißt [185]. Es resultieren die

ligierten Exons, die mit der RNA von Stämmen, in denen CdlSt1 nicht vorkommt, identisch sind. Somit kann das Protein fehlerfrei gebildet werden. Die Fähigkeit zum autokatalytischen Spleißen liegt in der hoch konservierten RNA-Sekundär- und Tertiärstruktur der Gruppe-I-Introns.

Die verschiedenen Gruppe-I-Introns weisen sehr große Unterschiede in ihrer Größe und Sequenz zueinander auf, jedoch ist eine Serie von kurzen Sequenzfolgen hoch konserviert. Es handelt sich dabei um die P-, Q-, R- und S-Sequenzen. Dabei bilden Teilbereiche von P und Q sowie R und S Basenpaarungen aus, von denen sich eine konservierte Struktur ableiten lässt [31-33, 53]. Die Introngrenzen sind streng von jeweils einem Nukleotid definiert. Im 5'-Bereich handelt es sich dabei um ein Uracil, im 3'-Bereich um ein Guanosin. Die charakteristische Sekundärstruktur leitet sich von gepaarten Sequenzbereichen ab, die mit P1-P10 bezeichnet werden [31-33, 53]. Das 5' gelegene P1-Pairing beinhaltet Paarungen mit der 5'-Exonsequenz. Dieser Bereich wird als „Internal Guide Sequence“ (IGS) bezeichnet. Die Pairings P3-P8 bilden das katalytische Zentrum von Gruppe-I-Introns aus. Die Klassifizierung der Gruppe-I-Introns wird nach der durch die Pairings P1-P10 vorgegebene Sekundärstruktur in vier große Untergruppen (IA-ID) eingeteilt [53, 54].

1.3.2.4 Weitere, in nativen Gruppe-I-Introns vorkommende Reaktionen

Bei veränderten Gruppe-I-Introns, die schlechter reagieren, treten hydrolytische Abspaltungen der Exons auf (Inoue et al., 1986). Nach der hydrolytischen Abspaltung des 3'-Exons, oder auch nach erfolgter Spleißreaktion, kann das nun freie 3'-Ende des Introns an bestimmten Stellen im Intron angreifen. Hieraus resultiert eine Abspaltung des 5'-Exons mit einem Teil des Introns, bzw. eine Abspaltung des 5'-Endes des Introns, und eine Cyclisierung des restlichen Introns (Burke, 1988). Bei CdlSt1 finden diese Cyclisierungsreaktion ebenfalls statt. Hier konnten zwei verschiedene Cyclisierungsstellen identifiziert werden. Der Angriff des terminalen 3'-Guanosin fand entweder nach dem zweiten oder nach dem 94. Nukleotid der Intronsequenz statt [185].

1.3.2.5 Mobilität bei Gruppe-I-Introns

Für die Mobilität der Gruppe-I-Introns sind zwei Mechanismen bekannt: „Intron Homing“ und „reverses Spleißen“. Gruppe-I-Introns sind sowohl auf der Ebene der DNA, sofern sie Endonukleasen in ORFs kodieren, als auch auf RNA-Ebene, zur Mobilität fähig.

1.3.2.6 “Intron Homing“

Die Mobilität von Gruppe-I-Introns auf DNA-Ebene wird von der Aktivität sequenzspezifischer Endonukleasen vermittelt, die von ORFs der Introns kodiert werden [218,219]. Diese Endonukleasen erkennen homologe Sequenzen von 15-40 Basenpaaren eines intronlosen Allels und bewirken einen Bruch im DNA-Doppelstrang des Rezipienten [220]. Bei der Reaktion werden ssDNA-Enden gebildet, die homologe Exonsequenzen eines intronhaltigen Allels erkennen und so in den Donor-DNA-Strang eindringen, der dann als Matrize zur Reparatursynthese des Rezipienten dient. Dieser Vorgang führt zur Integration des Introns in den Rezipientenstrang [156,157]. Der Prozess des “Intron Homings“ wurde detailliert am t_d-Intron des Bakteriophagen T4 untersucht [221,222]. Ein ORF des Introns kodiert für die Endonuklease I-TevI, welche in der Lage ist, die intronlosen Rezipientenstränge 23 und 25 nt upstream der Intron-Insertionsstelle zu schneiden. Das “Intron Homing“ wird oft von Konversionen der flankierenden Exonsequenzen begleitet, die auf exonukleolytische Degradation der Rezipienten-DNA zurückzuführen sind [223]. Solche Konversionen flankierender Exons können als Marker verwendet werden, um Homing von Gruppe-I-Introns nachzuweisen [223, 224]. Untersuchungen zur Mobilität von Gruppe-I-Introns des Bakteriophagen T4 haben gezeigt, dass “Intron Homing“ im Kontext rekombinationsabhängiger DNA-Replikation stattfindet [222].

Eine Theorie zur Erklärung des “Intron Homing“, ist das Doppelstrangbruch-Modell (DSBR-Modell) [156,157]. Das DSBR-Modell besagt, dass das 3'-Ende des Rezipientenstrangs in die Donor-DNA eindringt. Die DNA-Synthese resultiert in der Bildung und Ausweitung einer ungepaarten DNA-Region, die als Matrize für die Reparatursynthese des nicht-eingedrungenen Rezipientenstrangs dient. Während

dieses Prozesses werden zwei Holiday-Strukturen gebildet, deren Auflösung entweder in „Cross-Over“- oder „Non-Cross-Over-Produkten“ resultiert.

Untersuchungen des Bakteriophagen T4 deuten darauf hin, dass es noch eine weitere Möglichkeit der Integration von Gruppe-I-Introns ins Genom gibt, in der keine Holiday-Strukturen ausgebildet werden [222]. In diesem Strang-Annealing-Modell (SDSA-Modell) dringt, wie bei dem DSBR-Modell, das 3'-Ende des Rezipientenstrangs in die Donor-DNA ein, worauf ein D-Loop gebildet wird, der mit dem Replikationsende des neu-synthetisierten Strangs mitwandert [156]. Dieser neu gebildete DNA-Strang dissoziiert vom Donorstrang und dient als Matrize für Reparatursynthese des nicht eingedrungenen Rezipientenstrangs, so dass ausschließlich Non-Cross-Over Produkte gebildet werden.

1.3.2.7 Reverses Spleißen

Das reverse Spleißen erfolgt auf RNA-Ebene und stellt den ersten Schritt der Transposition über RNA-Intermediate dar. Es wird angenommen, dass sich ein Gruppe-I-Intron mit Hilfe des normalen Spleißprozesses aus der prä-RNA ausspleißt und anschließend durch reverses Spleißen in eine intronlose Rezipienten-RNA integriert [229]. In Anwesenheit einer reversen Transkriptase kann diese in DNA transkribiert werden und durch homologe Rekombination ins Genom integriert werden [156]. In-vitro-Experimente mit dem 26S-rDNA-Intron aus *T. thermophilus* haben gezeigt, dass reverses Spleißen bei hohen RNA- und Mg²⁺-Konzentrationen, bei Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 42°C und der Abwesenheit von exogenen Guanosins begünstigt wird [229]. Es wird zunächst die Bindung zwischen dem 3'-Exon und dem 3'-Ende des Introns hergestellt [225], anschließend die Bindung zwischen 5'-Exon und 5'-Ende des Introns. Für diesen Vorgang ist die Interaktion einer kurzen Sequenz des 5'-Exons und der IGS des Introns notwendig. Für das Tetrahymena-Intron erwies sich eine Erkennungssequenz von 4 nt im 5'-Exon als ausreichend, um in vitro in eine homologe rRNA-Sequenz und in ein β -Globulin-mRNA einzuspleißen [229]. Das Einbringen des Tetrahymena-Introns in *E. coli* zeigt, dass das Intron auch in vivo in der Lage ist, sich in die homologe Position der bakteriellen 23S-rRNA zu integrieren [226], wobei meist eine Interaktion von 6 bis 13 bp mit der IGS erfolgt [227]. In-vivo-Experimente zum reversen Spleißen zeigen, dass die Umkehrung des

normalen Spleißprozesses von der autokatalytischen Aktivität der Gruppe-I-Introns abhängig ist [227]. Das bedeutet, Mutationen, die die Fähigkeit zum Selbstspleißen einschränken, verhindern ebenso das reverse Spleißen. Da das reverse Spleißen weniger sequenzspezifisch als das „Intron Homing“ ist, könnte es die Insertion von Gruppe-I-Introns in neue Sequenzpositionen ermöglichen [227].

1.3.2.8 Die „Introns Early“-Theorie

Im Jahr 1978 formulierte W. Gilbert die Hypothese, dass Introns die Evolution von Proteinen beschleunigen, indem durch sie neue Rekombinationstellen zur Verfügung gestellt werden. Auf diese Weise erzeugte neukombinierte Exons erhielten damit die Chance, sich zu etablieren, sofern sie funktionell und zugleich für den Wirt vorteilhaft waren [236]. Dieser Vorgang wird als „Exon Shuffling“ bezeichnet; Introns wurden als „Hot Spots“ für die Rekombination beschrieben [246, 237]. Die „Introns Early“-Theorie geht davon aus, dass Introns schon im Genom des Prokaryonten vorzufinden waren und entscheidenden Einfluss auf die Proteinevolution genommen haben [244-246]. Diese Sichtweise der „Introns Early“-Theorie führt zu einer Reihe von entscheidenden Folgerungen. Dazu gehört der Verlust von Introns bei Eubakterien. Denn mit der Annahme, dass Introns für die Evolution von Proteinen eine wichtige Rolle spielen könnten, musste man das Fehlen von Introns in Bakterien als sekundären Verlust deuten. Dieser wurde auf Grund eines starken Selektionsdrucks erklärt, der auf Bakterien ruht, für die eine schnelle Replikation und rationelle Genexpression wegen der kurzen Generationsfolgen offensichtlich ist [235]. Der Preis für ein dann rationalisiertes, effizientes und „stromlinienförmiges“ Genom der intronfreien Bakterien wäre der Verlust an Evolutionspotential [235] und ein Verlust von Introns bei homologen Genen, sofern die betreffenden Introns nicht in allen homologen Genen vorzufinden sind. In homologen Genen sind die Positionen von Introns nicht immer exakt gleich, insbesondere wenn homologe Gene mit größerer evolutionärer Distanz betrachtet werden. Dieser Umstand wird mit „Intron Sliding“ oder dem Synonym „Intron Drift“ umschrieben, was ein Rutschen des Introns in die neue Position bedeutet [244]. Ein weiterer Punkt, den es zu beachten gilt, ist mit der Hypothese verbunden, dass Introns die Ausbildung der ersten komplexen Gene ermöglichten und über Neukombinationen die Proteinevolution beschleunigten. Für die Funktionalität dieser Prozesse ist es Voraussetzung, dass die Integrationsphase (die Position des Introns

im Kodon) der Introns korreliert ist. Das bedeutet, dass die Introns an der gleichen Position innerhalb eines kodierenden Triplets inseriert sind. Ist ein Intron vor dem ersten Nukleotid des Triplets inseriert, liegt die Integrationsphase 0 vor. Bei einer Insertion nach dem ersten Nukleotid eines Triplets liegt die Integrationsphase 1 vor. Dementsprechend bezeichnet die Integrationsphase 2 die Insertion eines Introns nach dem zweiten Nukleotid eines Triplets. Nur so ist gewährleistet, dass bei einer Neukombination ein offenes Leseraster ohne Frameshift-Mutation ausgebildet werden kann.

1.3.2.9. Die „Introns Late“-Theorie

Die „Introns Late“-Theorie geht davon aus, dass Introns erst später in der Evolution in schon bestehende Gene inseriert sind [247-249]. Ein entscheidendes Argument ist, dass intervenierende Sequenzen mobile genetische Elemente sind. Nach der „Introns Late“-Theorie haben Introns keine Rolle bei der Entstehung von komplexen Genen in den Prokaryonten gespielt und die Proteinevolution durch „Exon Shuffling“- sofern sie denn stattfindet - ist ebenfalls nur von untergeordneter Bedeutung. Der Grund für das Fehlen von Introns in Eubakterien ist nach der „Introns Late“-Theorie nicht in einem massenhaften Verlust von Introns, wie von der „Introns Early“-Theorie postuliert, zu finden, sondern einfach in der Tatsache, dass Introns nie in deren offenen Leserastern vorhanden waren. Bei der Integration von Introns handelt es sich um voneinander unabhängige Insertionsereignisse in vorhandenen Genen. Eine Korrelation der Integrationsphasen von Introns kann daher nicht vorgegeben sein. Sollten bei homologen Genen Introns inseriert sein, wird hier von einem zufälligen Ereignis ausgegangen, da es nur wenige Beispiele hierfür gibt. Die „Introns Late“-Theorie schließt „Intron Sliding“ nach der Insertion von Introns in homologen Genen grundsätzlich aus, weil in dem Fall voneinander unabhängige Insertionsereignisse vorliegen. Aus dem Grund wird ein Zusammenhang zwischen dem Integrationsort von Introns und der dreidimensionalen Struktur der Proteine negiert.

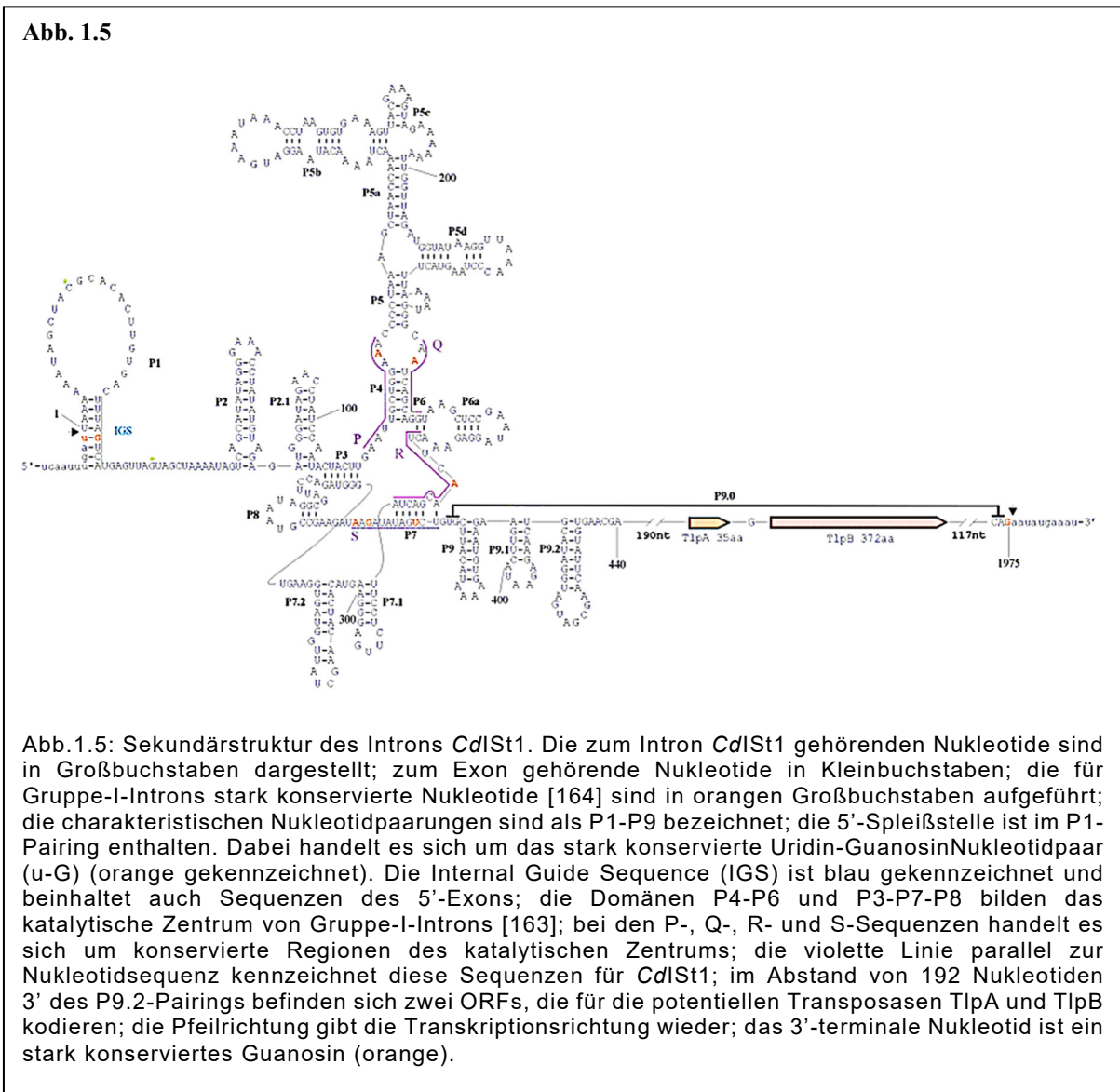
1.3.2.10. „Introns Early“ vs. „Introns Late“– gibt es einen gemeinsamen Nenner?

Die Debatte der „Intron Early“ versus „Intron Late“-Hypothesen hat bis heute nicht an Aktualität verloren. Sowohl die Vertreter der „Introns Early“-Theorie als auch die Vertreter der „Introns Late“-Theorie wiesen eine Vielzahl an Argumenten und Fakten auf, um ihre Hypothese zu untermauern. Erst 1998 wurde der Versuch unternommen, einen gemeinsamen Nenner für beide Theorien zu finden [250]. Die Arbeitsgruppe um De Souza und W. Gilbert versuchte, beiden Theorien gerecht zu werden und lieferte damit Erklärungsansätze für viele Streitpunkte [64]. Als Grundlage diente bei dieser Betrachtungsweise eine Intron-Datenbank. Bei diesem Ansatzpunkt wurde zwischen ursprünglichen Proteinen („ancient proteins“) und Proteinen evolutionär neueren Ursprungs unterschieden. Für die ursprünglichen Proteine konnte eine Phasenkorrelation der Introns belegt werden, und auch eine Korrelation der Intronposition zur dreidimensionalen Struktur der Proteine. Diese Beobachtungen waren nicht auf die Gruppe von neueren Proteinen übertragbar. Hier galten die Regeln der „Introns Late“-Theorie. De Souza et al. kam zu dem Schluss, dass zwei Drittel aller Introns neueren Ursprungs sind und später im Laufe der Evolution in die Gene inserierten. Demnach würden diese Introns der „Introns Late“-Konvention entsprechen. Ein Drittel aller Introns waren damit potentielle Kandidaten für ursprüngliche Introns, die der „Introns Early“-Konvention folgen.

1.4. *CdISt1* – eine Chimäre aus zwei mobilen genetischen Elementen

Bei der Untersuchung des Toxin-A-Gens (*tcdA*) aus dem *C.-difficile*-Stamm C34 fand sich eine Insertion von 1975 bp im *tcdA*-Gen. Die Insertion wird also offensichtlich auf RNA-Ebene wieder entfernt, das Toxin hat normale Größe und katalytische Aktivität [185]. Durch Sequenzierung und Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass das 1975nt große Fragment Elemente enthält, die typisch für Gruppe-I-Introns sind und außerdem Anteile, die Insertionselementen ähneln. Die Insertion wurde als *CdISt1a* bezeichnet [192]. Damit handelt es sich um das erste, in einem eubakteriellen Gen vorgefundene Gruppe-I-Intron. Im *C.-difficile*-Stamm C34 konnten zwölf Varianten des Introns identifiziert werden, die ausschließlich in eubakterielle Gene inseriert sind. Bei allen bisher getesteten *C.-difficile*-Stämmen konnte mindestens ein Intron, bzw. eine seiner Varianten, nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung anderer clostridialer

Spezies war kein Intron zu finden, so dass Gruppe-I-Introns als ein spezifisches Merkmal für *C. difficile* angesehen werden können [185]. Bei *CdIst1* handelt sich um ein chimäres genetisches Element, welches typische Merkmale von zwei genetischen Elementen aufweist und als IStron bezeichnet wird [185].



1.4.1 Der Insertionselementanteil

Im 3'-Anteil von *CdIst1a* befinden sich direkt downstream der P.9-Domäne von der Position 552 bis 1807 zwei offene Leseraster, die für ein „transposase-like Protein A“

(TlpA) mit einer Länge von 35 Aminosäuren und ein „transposase-like Protein B“ (TlpB) mit 372 Aminosäuren kodieren. Diese sind in derselben Richtung orientiert und werden nur durch ein Nukleotid voneinander getrennt [185]. Durch Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass TlpA eine hohe Homologie mit dem C-Terminus der IS200-ähnlichen Transposasen hat, wie sie etwa bei *Deinococcus radiodurans* zu finden sind. Im Vergleich zu den IS200-homologen Transposasen ist das TlpA jedoch wesentlich kleiner, was zu der Annahme führt, dass es sich bei dem zugehörigen CdlSt1-Anteil um die Überreste einer IS200-ähnlichen Transposase handeln könnte. Im Gegensatz hierzu kodiert tlpB für eine komplette Transposase, die starke Ähnlichkeit mit den Transposasen aus dem Insertionselement IS1341 aufweist. Das gemeinsame Vorkommen von Transposasen der Gruppen IS200 und IS1341 ist typisch für die Familie IS605 der IS-Elemente [185]. Bei der IS605-Familie verläuft allerdings die Transkriptionsrichtung der Transposasegene zumeist entgegengesetzt [194]. Außer der starken Übereinstimmung auf der Sequenzebene bei den Transposasen gibt es weitere Gemeinsamkeiten zwischen CdlSt1 und den Insertionselementen der Familie IS605. Alle IS605 integrieren direkt hinter einer konservierten fünf oder sechs Nukleotide langen Sequenz mit ihrem 5'-Ende und verdoppeln diese Sequenz bei der Integration, im Gegensatz zu vielen anderen Insertionselementen, nicht. Die stärksten Homologien zu den Transposasen aus CdlSt1 finden sich bei den Transposasen TnpB und TnpC aus dem Insertionselement IS8301 aus *Deinococcus radiodurans*, das auch zu der Gruppe der IS605-ähnlichen Insertionselemente gehört. Beide Elemente integrieren hinter der konservierten Sequenz TTGAT. Im Unterschied zu den meisten IS605 sind die beiden offenen Leseraster bei CdlSt1 genauso wie bei IS8301 in derselben Richtung orientiert [185]. In Anbetracht der Gemeinsamkeiten von CdlSt1 und IS8301, ist davon auszugehen, dass sie ähnliche Mobilitätsmechanismen besitzen.

[211]. Bei der Exzision wird genau die Lücke hinterlassen, in der die Donor-DNA integriert wird, so dass keine „Target Site Dublication“ auftritt [209]. Das bedeutet, dass die Reaktion ohne Gewinn oder Verlust von Nukleotiden oder der Notwendigkeit von DNA-Reparatur-Faktoren abläuft. Alle Reaktionsschritte von IS608 werden durch eine einzige, 155 Aminosäuren große Transposase (TnpA) katalysiert [211].

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Transposition von IS608 aus der IS200/IS605-Familie über ssDNA abläuft [208, 209, 210]. Entscheidende Reaktionsmechanismen konnten aufgeklärt werden [211]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass sich in Anwesenheit von TnpA vorgeformte Transposon-Kreuzungen in TTAC-haltige Zielsequenzen integrieren, und dass TnpA bei der Transposition von IS608 nur über einem DNA-Strang, und nicht über Wechselwirkung mit dem komplementären Strang agiert [208, 209, 210, 211]. Wenn sich die Funktion von TnpA ausschließlich auf ssDNA beschränkt, ergeben sich interessante Schlussfolgerungen. DNA-Einzelstränge bilden sich während eines normalen zellulären Prozesses aus, wie die rückständige Strang-Synthese während der DNA-Replikation, so dass das gebundene TnpA leicht eine TTAC-haltige ssDNA-Zielsequenz finden kann. Die Beschränkung der Transposition auf eine Phase im Zellzyklus würde auch sicherstellen, dass die Reaktion substratlimitiert ist und so destruirende und zellschädigende Einflüsse einschränkt. Die Bedeutung der ssDNA-Substrate für die IS200 Transposition wird durch neuere Arbeiten zu „Deinococcusradiodurans“ deutlich. Für IS8301 aus „Deinococcusradiodurans“ weisen tlpA und tlpB aus CdISt1 die größte Homologie auf. „Deinococcusradiodurans“ kann mit einem „Extended Synthesis Dependend Strand Annealing“-Mechanismus (=erweitertes syntheseabhängiges Strangglühen) seine zerbrochenen Chromosomen rekonstruieren [212]. Die Auswertungen haben ergeben, dass 15% der neu synthetisierten DNA aus Einzelstrang-DNA bestand und dass die Transpositionsaktivität von ISDra2, einem Element aus der IS200/IS605 Familie, auf das fünfhundertfache erhöht war [213]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ssDNA ein limitierender Faktor ist.

IS608 verwendete DNA-Sequenzen, die vom Transposon selbst erkannt wurden. Eine ähnliche Wechselbeziehung zwischen Protein und DNA bei der Schaffung von geeigneten Substraten erinnert an die Verflechtung von Protein und RNA in Ribosomen [214]. Es ist außerdem eine auffallende Parallele zwischen

Transpositionsmechanismus von IS608 und der Mobilität von Gruppe-II-Introns, vor allem dem bakteriellen L1.LtrB-System, beschrieben worden [217, 215, 216]. Barbas et al. konnte damit zeigen, dass die bekannten Selbstspleißmechanismen, die als typisch für RNA-basierte mobile Systeme galten, auch im Rahmen eines mobilen DNA-Elements auftreten, wobei sich das IS608 der Unterstützung durch TnpA bei der Durchführung des erforderlichen Spleißens und des Strangtransfers bedient.

1.4.2 Struktur und Funktion des Intronanteils von CdlSt1

Der 5'-Anteil von CdlSt1a enthält viele Elemente, die für Gruppe-I-Introns typisch sind. Es finden sich sowohl die typischen, hochkonservierten P-, Q-, R-, und S-Sequenzen, (P: aauugcuggaaa, Q: aaucagcagg, R: cuucaacgacua, S: aagauauagucu) die den katalytischen Kern eines Gruppe-I-Introns durch Ausbildung der P4- und P7-Domäne aufbauen, als auch die charakteristischen peripheren Loops und Domänen P1 – P9. Aus der RNA-Sekundärstruktur von CdlSt1 ist erkennbar, dass sich dieses Gruppe-I-Intron in einer Reihe von Merkmalen von bislang beschriebenen Gruppe-I-Introns unterscheidet. Die größte Ähnlichkeit besteht zu Gruppe-I-Introns des IA2-Subtyps, der durch die Ausbildung der Pairings P7.1 und P7.2 gekennzeichnet ist, und zudem, wie auch CdlSt1, über die Pairings P9, P9.1 und P9.2 verfügt [163]. Die ausgedehnte P5-Domäne von CdlSt1 ist allerdings nicht in Gruppe-IA2-Introns vorzufinden; in diesem Bereich ähnelt CdlSt1 eher Introns des Subtyps IC, zu dem auch das Intron aus *T. thermophila* zählt [163]. CdlSt1 kann keinem P10-Pairing zugeordnet werden. Typische P10-Pairings beinhalten Sequenzen des 3'-Exons und werden als funktionell nicht notwendig erachtet [159, 193].

Das Gen *tcdA-C34*, als Integrationsort von CdlSt1, wird funktionell translatiert, so dass das translatierte Toxin normale Größe und katalytische Aktivität aufweist [185]. Die Voraussetzung hierfür ist das effiziente Spleißen des Introns auf RNA-Ebene. Die Funktion der autokatalytischen Spleißaktivität der IStrons ist belegt [185]. Zusätzlich konnte für CdlSt1 eine für viele Gruppe-I-Introns typische Zyklisierung nach dem Spleißvorgang nachgewiesen werden [185]. Aufgrund der Lage der offenen Leseraster *tlpA* und *tlpB* von CdlSt1 wird das P9.0-Pairing über sehr große Distanz ausgebildet (Abb.1.6). Keines der bislang beschriebenen Gruppe-I-Introns kann eine vergleichbar

ausgedehnte P9.0-Paarung vorweisen. Sowohl dem P9.0- als auch dem P.10-Pairing wird eine zentrale Rolle bei der Koordination der 3'-Spleißstelle zugeschrieben [157, 159, 161]. Der Umstand, dass für CdlSt1 kein P10-Pairing nachweisbar ist, unterstreicht die Bedeutung des P9.0-Pairings für das zugrunde liegende Intron.

1.4.2 Charakteristika von Gruppe-I-Introns

Bezüglich Größe und Sequenz gibt es bei Gruppe-I-Introns sehr große Unterschiede, aber es existieren auch hoch konservierte Bereiche im katalytischen Zentrum. Diese P-, Q-, R- und S-Sequenzen kommen in allen Gruppe-I-Introns vor (P: AAUUNCNNGAAN, Q: AAUNNGNAGC, R: GUUCAGAGACUANA, S: AAGAUUAUAGUCC) (Cech, 1988). Des Weiteren weisen alle Gruppe-I-Introns eine charakteristische Sekundärstruktur auf, bestehend aus den Stemstrukturen P1, P3, P4, P5, P6, P7, P8 und P10 (Abb.1.6). Der starke Größenunterschied (von ca. 200nt bis zu ca. 2000nt), der bei den verschiedenen Gruppe-I-Introns zu beobachten ist, kommt zum einen durch zusätzliche periphere Elemente wie P2 und ausgedehnte P5- oder P9-Komplexe zustande, und zum anderen durch offene Leseraster, die in die Introns integriert sind.

Gruppe-I-Introns lassen sich in fünf Untergruppen unterteilen (Abb. 1.7), die sich durch ihre peripheren Elemente unterscheiden [164,244]. Das am besten untersuchte Gruppe-I-Intron, aus der großen ribosomalen Untereinheit von Tetrahymenaterrnophila, gehört zu der Untergruppe IC. Ein Beispiel für die Untergruppe IA1 ist das ScLSU Intron aus dem Precursor der ribosomalen RNA aus Hefemitochondrien; für die Untergruppe IA2 kann beispielhaft das sunY-Intron aus dem Phagen T4 genannt werden [163].

Abb. 1.7

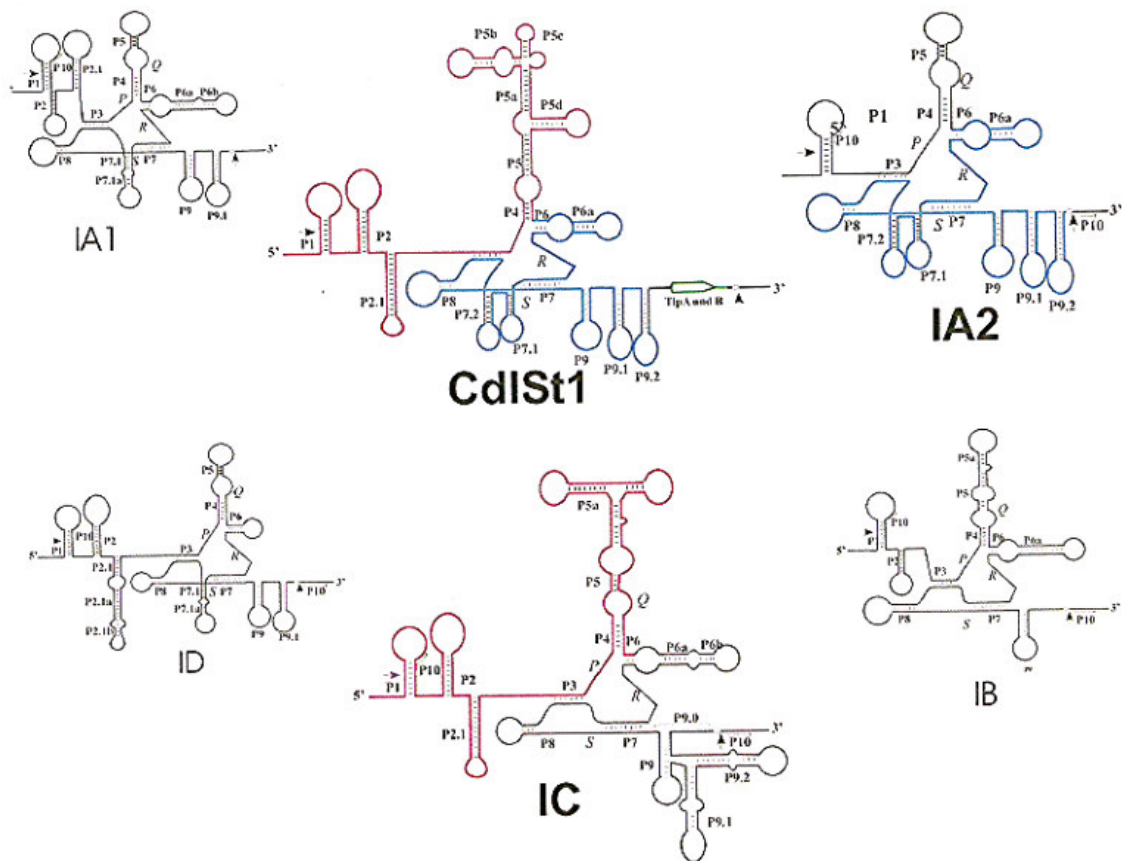


Abb. 1.7 Vergleich von Cd/ST1 mit anderen Gruppe-I-Introns

In ihrer Struktur vergleichbare Anteile von Cd/ST1 und anderen Intron-Untergruppen sind durch gleiche Farbgebung sowie durch fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet, (siehe oben) [nach Nitsche et al 2006].

1.4.3. Struktur und Funktion des Intronanteils von Cd/ST1

Der 5'-Anteil von Cd/ST1a enthält viele Elemente, die für Gruppe-I-Introns typisch sind. Es finden sich sowohl die typischen, hochkonservierten P-, Q-, R- und S-Sequenzen, (P: aaugcuggaaa, Q: aaucagcagg, R: cuucaacgacua, S: aagauauagucu) die den katalytischen Kern eines Gruppe-I-Introns durch Ausbildung der P4- und P7-Domäne aufbauen, als auch die charakteristischen peripheren Loops und Domänen P1-P9. Aus der RNA-Sekundärstruktur von Cd/ST1 ist erkennbar, dass sich dieses Gruppe-I-Intron in einer Reihe von Merkmalen von bislang beschriebenen Gruppe-I-Introns unterscheidet. Die größte Ähnlichkeit besteht zu Gruppe-I-Introns des IA2-Subtyps, der durch die Ausbildung der Pairings P7.1 und P7.2 gekennzeichnet ist, und zudem, wie auch Cd/ST1, über die Pairings P9, P9.1 und P9.2 verfügt [163]. Die ausgedehnte

P5-Domäne von CdlSt1 ist allerdings nicht in Gruppe-IA2-Introns vorzufinden, in diesem Bereich ähnelt CdlSt1 eher Introns des Subtyps IC, zu dem auch das Intron aus *T. thermophila* zählt [163]. CdlSt1 kann keinem P10-Pairing zugeordnet werden; typische P10-Pairings beinhalten Sequenzen des 3'-Exons und werden als funktionell nicht notwendig erachtet [159, 193].

Das Gen *tcdA-C34*, als Integrationsort von CdlSt1, wird funktionell translatiert, so dass das translatierte Toxin normale Größe und katalytische Aktivität aufweist [185]. Die Voraussetzung hierfür ist das effiziente Spleißen des Introns auf RNA-Ebene. Die Funktion der autokatalytischen Spleißaktivität der Introns ist belegt [185]. Zusätzlich konnte für CdlSt1 eine für viele Gruppe-I-Introns typische Zyklisierung nach dem Spleißvorgang nachgewiesen werden [185]. Aufgrund der Lage der offenen Leseraster *tlpA* und *tlpB* von CdlSt1 wird das P9.0-Pairing über sehr große Distanz ausgebildet. Keines der bislang beschriebenen Gruppe-I-Introns kann eine vergleichbar ausgedehnte P9.0-Paarung vorweisen. Dem P9.0- und dem P.10-Pairing wird eine zentrale Rolle bei der Koordination der 3'-Spleißstelle zugeschrieben [157, 159, 161]. Der Umstand, dass für CdlSt1 kein P10-Pairing nachweisbar ist, unterstreicht die Bedeutung des P9.0-Pairings für das zugrunde liegende Intron.

1.5 Vorteile der chimären Struktur von CdlSt1

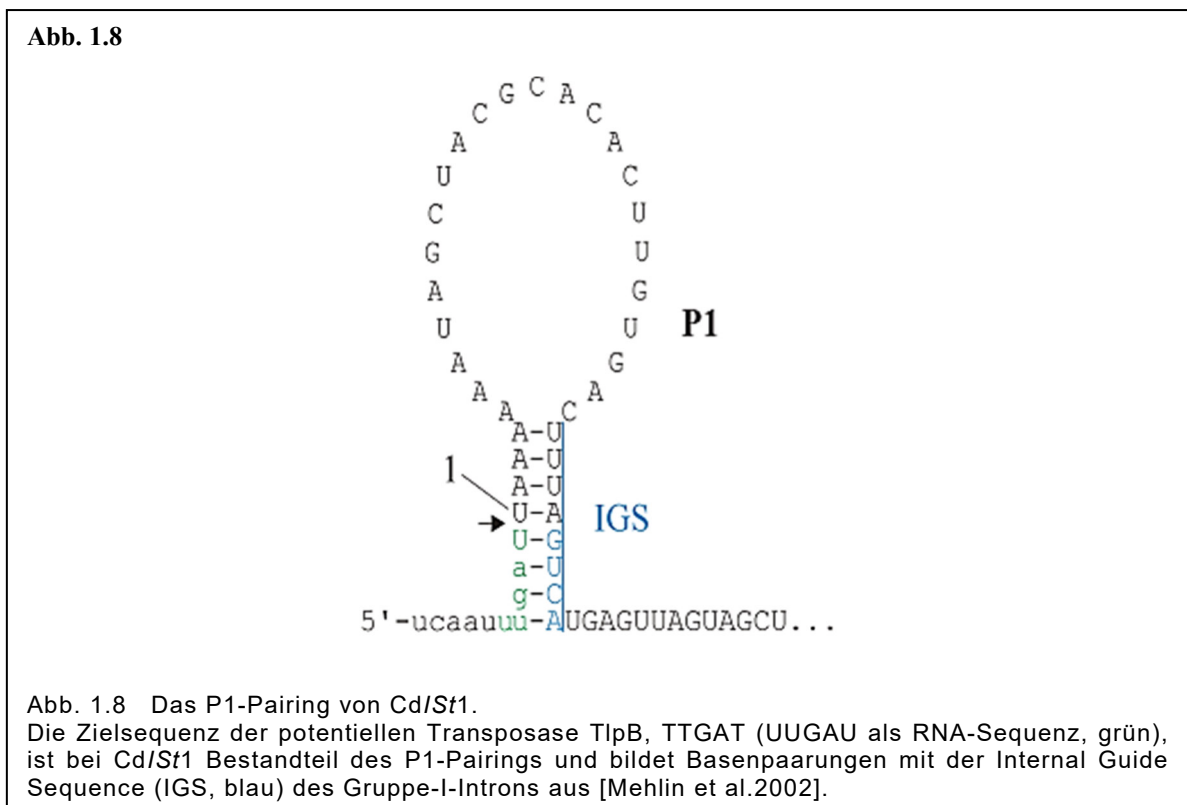
Alle bisher analysierten CdlSt1-Intron-Kopien bzw. Varianten enthalten ohne Ausnahme Strukturen aus beiden genetischen Elementen, dem Gruppe-I-Intron und dem IS-Element. Weder das IS-Element noch das Gruppe-I-Intron kommen als eigenständiges, genetisches Element im Chromosom von *C. difficile* vor. CdlSt1 stellt offensichtlich eine funktionelle Chimäre dar und beruht nicht auf dem Zufall einer einmaligen Integration eines genetischen Elements in das jeweilig andere. Beide Komponenten für sich sind funktionelle mobile genetische Elemente. Transposasen sind für die Mobilität von IS-Elementen verantwortlich, indem sie sie an ihre spezifische Zielsequenz binden und die DNA an der Integrationsstelle schneiden [132, 195]. Die gleiche Funktion erfüllen die für Gruppe-I-Introns typischen Endonukleasen, allerdings mit einem entscheidenden Unterschied. Die Erkennungssequenzen für Endonukleasen umfassen i.d.R. 12-40 Basenpaare [156,229]. Die von Endonukleasen

vermittelte Mobilität von Gruppe-I-Introns wird als Intron-Homing bezeichnet [157, 158, 156, 230, 229]. Bei diesem Vorgang integriert das Intron in ein intronfreies Allel. Solche ausgedehnten und hochspezifischen Erkennungssequenzen sind für die Mobilität im bakteriellen Genom ein beträchtlicher Nachteil, da potentielle Integrationsorte mangels intronfreier Allele faktisch nicht vorhanden sind.

Die potentielle Transposase TlpB von CdlSt1 kann einen entscheidenden Vorteil gegenüber den Endonukleasen bieten. Das als Zielsequenz für die Transposase definierte Pentanukleotid TTGAT liefert eine ausreichend große Zahl möglicher Integrationsstellen für das Intron im bakteriellen Genom. Darüber hinaus ist das Pentanukleotid auch an der Ausbildung des P1-Pairings beteiligt. Vier der fünf Nukleotide bilden Basenpaarungen zur „Internal Guide Sequence“ (IGS) aus (Abb. 1.8). Auf diese Weise ist die Formation des P1-Pairings, welches für die Koordination der 5'-Spleißstelle essentiell ist, stets gewährleistet. An der Integrationsstelle von CdlSt1 erfolgt keine Sequenzduplikation, wie es bei der Integration von IS-Elementen der Regelfall ist. Das lässt sich auf die potentielle Transposase TlpB zurückzuführen. Wie oben ausführlich dargestellt, weist TlpB eine hohe Homologie zu den Transposasen der IS605 Familie auf, deren charakteristische Eigenschaft die Integration ohne Sequenzduplikation ist [132]. Sequenzduplikationen würden bei der Integration von CdlSt1 in bakterielle Gene mit großer Wahrscheinlichkeit zu Frameshift-Mutationen führen, die das Gen ausschalten könnten. Die über TlpB vermittelte Mobilität des Introns würde diese Gefahr ausschließen, legt man gleiche Mobilitäts-Mechanismen wie bei IS605-Transposasen, zugrunde.

Auf der anderen Seite könnte die Transposase entscheidend von der Intron-Komponente profitieren, da im Fall von CdlSt1 die Integration in ein bakterielles Gen nicht gleichbedeutend ist mit dessen Insertionsinaktivierung. Über die Spleißaktivität wird das Gruppe-I-Intron auf RNA-Ebene aus dem Gen entfernt, womit das betreffende Gen funktionell weiterhin aktiv bleibt. Das Überleben des Wirtsbakteriums wird daher durch Integration des Introns, wie etwa im Fall der Integration von IS-Elementen, nicht gefährdet.

Mit CdISt1 und dem im *recA*-Gen identifizierten Gruppe-I-Intron aus *Bacillus anthracis*, konnten bisher die einzigen Gruppe-I-Introns identifiziert werden, die sich in eubakteriellen Genen befinden [185, 186]. Nach der „Introns Early“-Hypothese ist davon auszugehen, dass es bei Eubakterien einen hohen Selektionsdruck zur Eliminierung von Introns gab und möglicherweise noch gibt [235]. Könnte CdISt1 seinem Wirt keinen Vorteil bieten, wäre seine Existenz in *C. difficile* auf lange Sicht gefährdet. Daher wird dem IStron und seinem Wirt ein auf symbiontischer Natur basierendes Verhältnis zugeschrieben.



1.5.1 Wechselbeziehung zwischen der Intron-Komponente und der Transposase

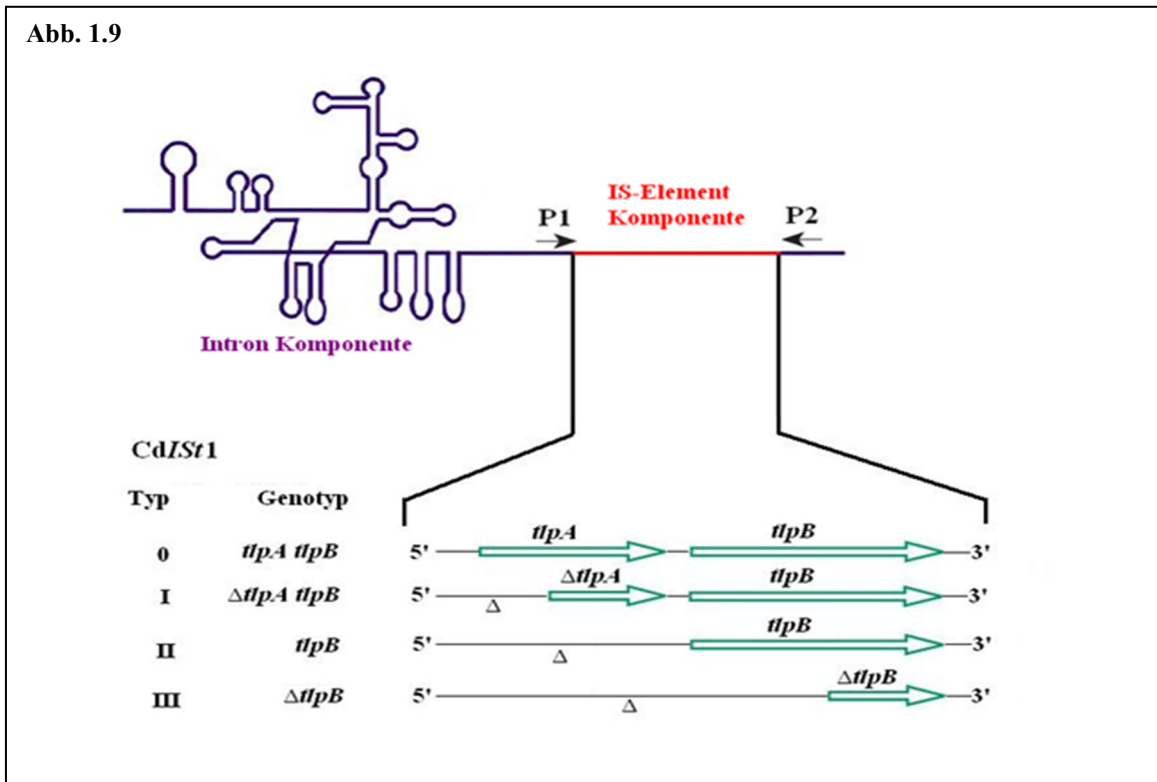
Für klassische Gruppe-I-Introns wird ein symbiontisches Verhältnis zwischen dem Intron-Anteil und dem Endonuklease-Gen beschrieben [231]. Bei einer solchen Deutung wird hinter der Endonuklease eine egoistische DNA (das Endonuklease-Gen) vermutet, die dem Wirt (dem Intron) die Mobilität sichert und als Gegenleistung ein phenotypisch unauffälliges Versteck gewährt [231]. Oben wurde bereits diskutiert, dass für die Funktionalität von CdlSt1 im bakteriellen Genom das Zusammenwirken der beiden anteiligen Komponenten erforderlich ist, die gleichsam aufeinander angewiesen zu sein scheinen. Klassische Gruppe-I-Introns benötigen nicht notwendigerweise einen ORF und wurden bis auf wenige Ausnahmen nicht in eubakteriellen Genen vorgefunden. Im Fall des IStrons CdlSt1 kann das tlpB-Gen als egoistische DNA betrachtet werden, deren Ausbreitung die Intron-Komponente vorantreibt bzw. generell erst ermöglicht. CdlSt1 kann als mobiles genetisches Element aufgefasst werden, das aus der Symbiose von egoistischer RNA (Intron-Anteil) und egoistischer DNA (Transposase) hervorgeht. Keine der Komponenten könnte den neuen Lebensraum in dieser Form für sich alleine erschließen, worauf auch das Fehlen des Nachweises potentieller Vorläuferelemente im *C.-difficile*-Genom hindeutet. Das ubiquitäre Vorkommen von CdlSt1 in der Spezies *C. difficile* beweist, dass eine derartige Symbiose offensichtlich sehr erfolgreich ist. Das IStron und dessen hoch homologen varianten Formen ist in allen untersuchten *C.-difficile*-Isolaten in variabler Kopienzahl zu finden [185, 196].

1.6 Varianten des IStrons

Bei der Untersuchung verschiedener *C.-difficile*-Stämme hat sich gezeigt, dass diese CdlSt1 in ihrem Genom in unterschiedlicher Anzahl (von 4 bis 12 Kopien), jeweils integriert in verschiedenen ORFs, enthalten sind. Im *C.-difficile*-Stamm C34 existieren zwölf Kopien des IStrons [185]. Im Vergleich zum 1975 bp großen IStron CdlSt1 (Typ I) sind einige IStron-Varianten um ca. 100 bp (Typ II) und eine um ca. 1200 bp (Typ III) kürzer. Hierbei umfasst die Deletion der IStron-Typen II und III ausschließlich Strukturen des IS-Element-Anteils (tlpA bzw. tlpA und tlpB). Beim Screening weiterer *C.-difficile*-Stämme konnte im *C.-difficile*-Stamm SE918 eine zusätzliche IStron-

Variante identifiziert werden, die im Vergleich zum Typ-I-IStron um ca. 239 bp verlängert ist [196]. CdlSt1a-SE918 ist in einem ORF integriert, der homolog zu dem von *Thermogotamaritima* kodierten 16S Pseudouridylat-Synthase ist. Die in CdlSt1a-SE918 zusätzliche DNA-Strecke von 239 bp befindet sich upstream des *tlpA*-Abschnitts vom Typ-I-IStrons (Abb. 1.9). Diese zusätzliche Sequenz ist in Frame mit dem Rest des *tlpA* und enthält ein TAA-Stopcodon an Position 40. Innerhalb der CdlSt1-0 IStron Varianten findet sich eine potenzielle Shine-Dalgarno-Sequenz im Abstand von 7 bp vor dem Startcodon des ORF *tlpA*. Es scheint, dass das *tlpA* aus den CdlSt1-0-Varianten für ein komplettes transposase-like Protein kodiert [196]. Die berechnete TlpA-Größe (135 Aminosäuren) und molekulare Masse (16 kDa) sind typisch für IS200 homologe Transposasen. Die putative TlpA Transposase der CdlSt1-0 Variante zeigt hohe Ähnlichkeit mit IS200 homologen Transposasen von *C. perfringens*, *Deinococcus radiodurans*, *Methanosarcina mazei* Stamm Goel und *Helicobacter pylori* (TnpA). Die Spleißaktivität von CdlSt1a-SE918 Typ-0 wird offensichtlich trotz des großen Abstands von mehr als 1750 bp zwischen den Kern-Intron Strukturen und der 3'-Spleißstelle nicht beeinträchtigt [196]. Bis jetzt konnten vier Arten des chimären genetischen Elements CdlSt1 gefunden werden, die in Abbildung 1.9 als CdlSt1-0 (TlpA / TlpB), CdlSt1-I (Δ TlpA / TlpB), CdlSt1-II (TlpB), und CdlSt1-III (Δ TlpB) aufgeführt sind. Alle CdlSt1 besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterscheiden sich aber in ihrem IS-Element-Komponenten [185, 196]. Die CdlSt1-0-Varianten scheinen ein fast vollständiges IS-Element der IS605 Familie zu besitzen, die für zwei komplette transposaseähnliche (transposase-like) Proteine (TlpA und TlpB) kodieren. Wir gehen davon aus, dass die CdlSt1-0-Varianten, die in dem *C.-difficile*-Stamm SE918 entdeckt wurden (CdlSt1a-SE918), eine ursprungsnaher Form des IStrons darstellen. Das genetische Element CdlSt1 ist, wie bereits oben ausführlich dargestellt, eine Kombination aus einem Gruppe-I-Intron und einem Insertions-Sequenz-(IS)-Element. Die putativen Proteine TlpA und TlpB zeigen eine hohe Homologie zu Transposasen, die charakteristisch für IS-Elemente des IS605-Typs sind [196]. Sequenzanalyse mehrerer Varianten von CdlSt1-C34 und ihrer Integrationsstellen zeigen, dass die IStrons eine IS605-Mobilität besitzen [185, 197]. Wegen der oben diskutierten Zusammenhänge bestand für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass die IS-Element Komponente die Ausbreitung von CdlSt1 vermittelt und deren Intron-

Komponente für ein effizientes Spleißen der mRNA-Vorläufer des Wirts-ORF verantwortlich ist.



2 Ziel der Untersuchung

Analysen der Sequenz und der Integrationsstellen mehrerer *CdISt1*-Varianten hatten gezeigt, dass das IStron charakteristische Eigenschaften des IS605 besitzt, wie z.B. dessen Mobilität. Da *CdISt1* ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C.-difficile*-Genom integriert, war es naheliegend anzunehmen, dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Integrationsort und Mobilitätsmechanismus besteht. Die Hypothese war, dass die Kombination des Gruppe-I-Introns mit dem IS-Element dem IStron einen Mobilitätsmechanismus zur Verfügung stellt, der auf die Verbreitung des mobilen Elements *CdISt1* in prokaryonten Organismen spezialisiert ist. Dabei wird als Grundlage angenommen, dass die IS-Element Komponente des IStrons die Ausbreitung von *CdISt1* vermittelt, während die Intron-Komponente für das effiziente Spleißen aus transkriptionsaktiven Genen (mRNA-Vorläufern) verantwortlich ist.

Der Mechanismus der Mobilität des *CdISt1* an sich ist von besonderer Bedeutung, da er sowohl die Häufigkeit des Springens des IStrons als auch den Ort der Integration maßgeblich bestimmt, springt es in einen ORFs, in eine strukturelle RNA oder aber in nicht-kodierenden Regionen des Chromosoms. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich ist, stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch aus. Basierend auf der IStron Typ-0-Variante sollte ein Modellsystem etabliert werden, um Mechanismen und Strukturen zu charakterisieren, die die Mobilität des IStrons vermitteln.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die für die Analyse des Mechanismus der Mobilität nötigen Konstrukte zu generieren und deren *in vitro* Funktionalität nachzuweisen und erste *in vivo* Untersuchungen in *Listeria innocua* als bakteriellen Modell-Organismus vorzunehmen.

Dieses Ziel sollte durch folgende Zwischenschritte erreicht werden:

- Herstellung von Typ-0-IStrom Varianten, die modular einsetzbar sein sollten – unter anderem Entfernung eines Stopcodons, Einführung von Klonierungsstellen und Einklonierung eines Markergens,
- Herstellung von „Paaren – positiv/negativ Kontrollen für in-vitro Untersuchungen,
- Nutzung des Suizidplasmids pAULA-A als Transfervehikel in einen lebenden Organismus,
- Einsatz der hergestellten molekulargenetischen Konstrukte in in-vivo Experimente in *Listeria innocua* als Modellbakterium.

Mit den Experimenten sollte zum einen gezeigt werden, welche Veränderungen im IStrom vorgenommen werden können, ohne deren in vitro Aktivität (z. B im in-vitro Spleißassay) zu zerstören, zum anderen sollten erste Versuche unternommen werden, die Mobilität des CdISt1 in einem zweiten Wirt zu hinterfragen. Insgesamt galt es, die Mobilität des IStroms weiter zu charakterisieren.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

3.1.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Biochemika und Medienzusätze wurden von den Firmen Amersham, Buchler GmbH & Co. KG (Braunschweig), New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Bio-Rad Laboratories (München), Biozym Scientific GmbH (Hameln), Boehringer (Mannheim), Difco Laboratories Inc. (Detroit, USA), Gibco (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Schleicher & Schuell (Dassel) und Millipore GmbH (Eschborn) bezogen.

3.1.1.2 Enzyme

Dabei wurden im Einzelnen verwendet: DNase, RNase-frei (Amersham, Biotech), Restriktionsendonukleasen (Biolabs, MBI-Fermentas), Reverse Transkriptase Superscript (Gibco), RNase Inhibitor (MBI-Fermentas), RNase A (Roth), Shrimp Alkaline Phosphatase (MBI-Fermentas), Taq-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas), T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas), T7-RNA-Polymerase (MBI-Fermentas)

3.1.2 Bakterien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu Klonierungszwecken und für Plasmidpräparationen verwendeten *E. coli* Stämme sind nachfolgend mit ihrem Genotyp aufgelistet:

- DH5 α F⁻ (Φ 80d Δ (lacZ)M15)recA1, endA1, gyrA96, thi1, (r_k⁻m_k⁺), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF)U169
- Top10 F⁻mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG

Für Klonierungen wurde in der Regel *Escherichia coli* Bakterien vom Stamm Top 10 oder DH5 α und mit *Listeria innocua* gearbeitet. Für Transformationen wurden *E. coli* Top 10 als chemisch kompetente One-Shot-Zellen der Firma Invitrogen oder als selbst hergestellte elektrokompetente *E. coli* Top10 eingesetzt.

3.1.3 Plasmide und DNA

Für die Arbeiten mit rekombinanter DNA in *E. coli* und *L. innocua* wurden, entsprechend den jeweiligen Erfordernissen, verschiedene Vektoren eingesetzt. Dabei wurden folgende Plasmide verwendet: pTZ19R von der Firma Fermentas, der aus dem TOPO™ TA Cloning™ Kit der Firma Invitrogen™ stammende Vektor pCR2.1. (siehe Anhang) und das Suizidplasmid pAUL-A, ein Derivat der pE194-Familie von Suizidplasmiden [233]. Des Weiteren wurde chromosomale DNA aus *C. difficile* C34 und SE918 verwendet. Die für PCR benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agar, dem entweder Ampicillin oder Kanamycin zur Selektion zugesetzt wurde.

LB: 1l Messkolben + Rühfisch + 200ml H₂O, + 50g NaCl, 25g Hefeextrakt, 50g Bactotrypton, auf 800ml auffüllen, lösen mit TrisHCl pH 8,0 auf pH7,5 einstellen auf 1000ml auffüllen, vor Gebrauch wurde LB 5x 1:5 mit sterilem H₂O verdünnt.

LB amp.: Für LB-Amp-Medium oder Platten wurde eine Ampicillin-Konzentration von 100 μ g/ml verwendet

LB kan: Für LB-Kan-Medium oder Platten wurde eine Kanamycin-Konzentration von 50 μ g/ml verwendet

LB-Platten: 2% Agar (8gAgar) wurden zu 80ml LB5x und 400ml H₂O gegeben. Das Ganze wurde 45 Minuten autoklaviert und auf dem Magnetrührer abgekühlt, bis es handwarm war. Bei Bedarf wurde das entsprechende Antibiotikum zugeben und es wurden ca. 20 Platten bei brennendem Gasbrenner gegossen.

3.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden die Methoden der Hitzeschocktransformation oder der Elektroporation verwendet. Bei Verwendung eines kommerziellen Klonierungs-Kits (TOPO™ TA Cloning™ Kit) der Firma Invitrogen™ (Karlsruhe) wurden die Experimente entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Mit dem TOPO™TACloning™ Kit wurden PCR-Produkte direkt in den zu dem Kit gehörenden Vektor pCR2.1 kloniert und im Folgeschritt in den mitgelieferten *E.-coli*-Top10-Stamm transformiert. Die Transformationsprozedur richtete sich nach den Herstellerangaben. Für die Transformationen rekombinanter DNA in *E. coli* durch Elektroporation wurde ein modifiziertes Protokoll nach Dower *et al.* [253] genutzt. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen wird nachfolgend beschrieben. Für die Elektroporation stand ein Gene Pulser™ der Firma Bio-Rad Laboratories mit einem Pulse Controller zur Verfügung.

3.2.1.3 Herstellen von elektrokompetenten Zellen

Eine 5ml Übernachtskultur wurde in 400 ml LB Medium überimpft, und unter starkem Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5-1,0 angezogen. Die Bakterien wurden kurz auf Eis gekühlt, und dann in 8x50ml Falcon™-Röhrchen gefüllt. Durch Zentrifugation bei 4000g und 4°C für 15 Minuten wurden die Bakterien geerntet. Die Bakterienpellets wurden mit 5ml kaltem Wasser aufgeschüttelt, und dann auf je 50ml aufgefüllt und zentrifugiert (Gesamtvolumen 400ml). Die Pellets wurden wieder in 5ml kaltem H₂O aufgeschüttelt, und dann wurden je zwei Proben gepoolt und wieder auf 50ml mit Wasser aufgefüllt (Gesamtvolumen 200ml) und erneut zentrifugiert. Die 4 Bakterienpellets wurden in insgesamt 10 ml kaltem, zehnpotentigem Glycerin aufgeschüttelt, gepoolt und wieder abzentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in 2 ml Glycerin resuspendiert, und in 50µl Aliquots in flüssigem N₂ gefroren. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

Materialien:

1x LB Medium, steriles kaltes Wasser, kaltes 10%iges Glycerin

3.2.1.4 Elektroporation

Die elektrokompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 4µl der DNA oder des Ligationsansatzes mit 40µl der Zellen durch pipettieren gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach einer Minute Inkubation auf Eis wurde der Elektroporationspuls (25 µF, 2,0 kV, 200 Ω) abgegeben. Die Zellen wurden sofort in 300µl SOC resuspendiert, und nun für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Materialien:

SOC: 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM D-Glucose in LB-Medium (1ml 1M MgCl₂, 1ml 1M MgSO₄, 2ml 1M D-Glucose 96ml LB)

3.2.1.5 Hitzeschocktransformation

Die Hitzeschocktransformation wurde mit chemisch kompetenten Zellen der Firma Invitrogen™ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1.6 Kulturmedien und Anzucht von Listerien

Listeria-Stämme werden in BHI-Medium herangezogen.

- BHI-Medium: 37g Hirn-Herz-Glucose-Bouillon ad 1L Wasser

BHI-Agar: BHI 1fach Medium wurde mit 2% Bacto™ Agar (Roth) versetzt und autoklaviert. Die autoklavierte Lösung wurde dann unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer auf etwa 50°C abgekühlt, je nach Bedarf wurden Antibiotika zugegeben und die Platten danach unter sterilen Bedingungen zügig gegossen (pro Petrischale ca. 15-20 ml; ergab ca. 20 Platten).

- Für ein 400ml Ansatz (ca. 20 Platten) ergaben sich 120mg Erythromycin ad 1ml Ethanol

Die Zugabe der Antibiotika richtete sich nach den auf den Klonierungsvektor kodierten Resistenzen. Die Tabelle 3.1 listet die in der vorliegenden Arbeit genutzten Substanzen.

Tabelle 3.1:
Stammlösung und Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika bei *E.-coli* und *L.-innocua*-Kulturen

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Endkonzentration
		In <i>E. coli</i> - Kulturen	In <i>Listeria</i> -Kulturen
Ampicillin	100mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	
Chloramphenicol	30mg/ml in Ethanol	30 µg/ml	5-10µg/ml
Erythromycin	100 mg/ml in Ethanol	600 µg/ml	5 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml	

3.2.1.7 Lagern von *Listerien*

Zur Aufbewahrung wurden die gut gewachsenen *Listerien*kulturen mit 30% Glycerin versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. So vorbereitete *Listerien* bleiben bei -70°C gelagert für lange Zeit vital.

3.2.1.8 Protoplasten-Transformation von *Listerien*

3.2.1.8.1 Präparation der Protoplasten

Zur Herstellung von *Listerien*-Protoplasten wurde eine Vorkultur von 25ml mit einem Aliquot der eingefrorenen Bakterien beimpft und in BHI+0,2% Glycin angelegt (in Falcon™). Von dieser Übernachtskultur wurden 125µl am nächsten Morgen erneut in 25ml BHI-Kultur (Falcon™) überimpft und bei 37°C bis zu einem OD600 von 0,7 angezüchtet. (Wachstumsdauer betrug ca. 3,5-4 Stunden). Die Kultur wurde Anschließend in einer Heraeus Minifuge RF bei 5000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1/10 Volumen (=2,5ml) SMMP aufgenommen und 10mg/ml Lysozym (aus 10x Stammlösung in 2x SMM) hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C über Nacht (12-16h) im Brutschrank, ohne Schütteln, inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Protoplasten.

Die so vorbereiteten Protoplasten wurden bei 5000rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur geerntet und das Pellet einmal mit 10ml SMMP gewaschen. Das Pellet wurde in 1/10 (=2,5ml) Volumen SMMP resuspendiert, in Aliquots von 300µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Protoplasten wurden auf Kontrollplatten selektioniert (1xBHI, 1xBHI+5µl erm)

3.2.1.8.2 Transformation der Protoplasten

Für die Transformation wurden jeweils 300µl Protoplasten (=ein Aliquot) auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der Plasmid-DNA (0,5-1,0µg) gemischt (falls Plasmidvolumen > 10µl, wurde 1:2 in 2x SMM verdünnt). In einem Falcon-Tube wurden 2ml Fusogen (RT) vorgelegt, in welches das Protoplasten-/Plasmid-Gemisch mit abgeschnittener Pipettenspitze zugegeben wurde. Das Gemisch wurde 30 Sekunden leicht geschwenkt und für 30 Sekunden stehengelassen. Dann wurden 7ml SMMP zugegeben und durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Anschließend wurden die Protoplasten bei Raumtemperatur abzentrifugiert (4000rpm in Heraeus Minifuge, 20 Minuten bei Raumtemperatur). Danach wurde das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit abgeschnittener Spitze in 1ml SMMP gelöst und für ca. 3 Stunden bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Die Protoplasten wurden dann vorsichtig auf DM3-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

DM3 Regenerationsplatten

			<u>Ansatz:</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 5% Agar 	200ml/l		10g Agar auf 200ml H ₂ O <ul style="list-style-type: none"> ▪ in 1l-Flasche (Rührfisch zugeben)
<ul style="list-style-type: none"> • 1M Na-Succinat 	500ml/l:		Siehe unten
<ul style="list-style-type: none"> • 5% Caseinhydrolysat (Pep140) 	100ml/l:		25g auf 500ml H ₂ O
<ul style="list-style-type: none"> • 10% Yeast Extrakt 	60ml/l:		50g auf 500ml H ₂ O
<ul style="list-style-type: none"> • K₂HPO₄ 3,5%+KH₂PO₄ 11,5% eine Lösung 	100ml/l:		17,5g + 7,5g ad 500ml H ₂ O
<ul style="list-style-type: none"> • 50% Glucose 	10ml/l:		100g auf 200ml H ₂ O
<ul style="list-style-type: none"> • 1M MgCl₂ 	20ml/l:		
<ul style="list-style-type: none"> • 5% BSA 	10ml/l:		sterilfiltriert

Alle Lösungen wurden getrennt autoklaviert, vor Gebrauch auf 55°C erwärmt und auf dem Magnetrührer gemischt. Dem abgekühlten Agar wurden nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

1N Na-Succinat: 135,05g Bernsteinsäure (Na-Salz) Hexahydrat ad 500ml H₂O, pH7,3 mit HCL.; in 1l Flasche autoklavieren.

5% Caseinhydrolysat (Pep140): GIBCO Cat. No. 50014-034

Lösungen:

2x SMM

g/200ml

- 0,1M Sucrose 68,4
- 0,02M Tris 0,49
- 0,01M MgCl₂ 0,41
- 0,04M Maleinsäure 0,93
- pH 6,8 wurde mit NaOH eingestellt, 12 min autoklavieren (Lösung sollte nicht braun werden)

4x Bacto Pernassay Broth (BPB):

- 16g NutrientBroth (Difco)
- 14g Bacto™ Peptone (Difco)
- 12,4g Yeast Extract (Difco)
ad 1000ml H₂O, pH6,8, autoklavieren
- 5% BSA (Merck): 5g BSA in 100ml H₂O lösen. pH7,5 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren und aliquotieren (5ml). Lagerung bei -20°C

1x SMMP (wurde immer frisch angesetzt):

- | | | | |
|------------------------------------|---------|--------|--------|
| • 2x SMM je nach benötigter Menge: | 55,0 ml | 27,5ml | 13,8ml |
| • 4x PAB (BPB) | 40,0 ml | 20,0ml | 10,0ml |
| • 5% BSA | 5,0 ml | 2,5ml | 1,25ml |

Fusogen:

- 40g PEG 6000 + 50ml 2x SMM ad 100ml H₂O, pH6,8, autoklavieren, bei RT lagern

3.2.1.9 Plasmidpräparation aus Listerien

Zur Plasmidpräparation wurde jeweils eine 5ml Übernachtskultur in BHI-erm-Medium bei 37°C angesetzt. Die Übernachtskultur wurde am folgenden Tag abzentrifugiert (5 min bei 4000rpm), das Pellet in 200µl SET-Puffer aufgenommen, in ein Eppi™ Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und erneut für 5 Minuten bei 13000rpm abzentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde in 200µl kaltem (4°C) Aceton aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurde nochmals für 5 Minuten abzentrifugiert und alle Reste an Aceton vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 50mM Tris-HCL pH6,5 aufgenommen, 2µl (= 10 Units) Mutanolysin zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte der Plasmidpräparation wurden mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt, Vorgehen und Materialien laut Herstellerangaben (3.2.2.1.2)

SET-Puffer

- 50mM NaCl
- 30mM Tris-HCL
- 5mM EDTA
- mit HCl einstellen auf pH8,0

Mutanolysin: Mutanolysin in einer Konzentration von 5units/µl mit H₂O aufnehmen und Lagerung bei -20°C.

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 Präparation von DNA

3.2.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Mini-Präparation wurde eingesetzt, um kleinere Mengen DNA zu isolieren, um den Klonierungserfolg zu überprüfen oder um DNA für Sequenzierungen zu gewinnen. Aus einem Ansatz konnten etwa 30µg DNA isoliert werden.

Eine 5-ml-Übernachtskultur wurde geerntet (10 min, 4000 rpm, bei 4°C). Das Pellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert, und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Als nächstes wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben, und, nachdem durch Invertieren gemischt wurde, wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

Zugabe von 300 µl kaltem P3-Puffer wurde wieder durch invertieren gemischt, und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausfallenden Proteine und Zellreste wurden in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert (15 min, 14.000 rpm). Zum Fällern der DNA wurden 800µl des Überstandes mit 560µl (0,7 Volumen) Isopropanol und 10µl 10 M Ammoniumacetat 20 –30 Minuten auf Eis inkubiert, und danach 20 Minuten zentrifugiert (14.000 rpm). Das Pellet wurde mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 14.000 rpm). Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es in 40µl TrisHCl oder Wasser aufgenommen.

Materialien

P1 (Resuspensionspuffer): 50mM TrisHCl mit pH 8,0; 10mM EDTA; RNase A 100 µg/ml.
Lagerung des Puffers bei 4°C.

P2 (Lysepuffer): 200mM NaOH; und 1% SDS.
Lagerung des Puffers bei Raumtemperatur.

P3 (Neutralisationspuffer): 3M Kaliumacetat das mit Eisessig auf pH5,5 eingestellt wurde.
Lagerung des Puffers bei 4°C.

Ammoniumacetat: 10 M NH₄ Acetat

3.2.2.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Wenn größere DNA-Mengen benötigt wurden, wie bei der *In-vitro*-Transkription, oder wenn besonders saubere DNA benötigt wurde, wurden Anionenaustauscher-Säulen (QIAGEN Genomic-tip 100/G) der Firma Qiagen verwendet. Aus 30-50ml Übernachtskultur wurde mit Materialien und nach Anweisung des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. So konnten pro Ansatz zwischen 80 und 100µg DNA isoliert werden.

3.2.2.2 Modifikation von DNA

3.2.2.2.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde die entsprechende DNA in einem Reaktionsansatz von 30µl mit 3-8 Units/µg DNA des entsprechenden Enzyms für 1h bei 37°C inkubiert. Für den Reaktionsansatz wurden die Puffer des Herstellers eingesetzt.

3.2.2.2 Dephosphorylierung

Aus der verdauten DNA wurden mit dem Qiaex®-Kit der Firma Qiagen die Salze entfernt, und die DNA wurde mit Tris aus der Qiaex® II Suspension eluiert. Die so gereinigte DNA wurde in einem Volumen von 50µl mit SAP (Shrimp alkaline phosphatase von der Firma USB) und dem dazugehörigen Puffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, und anschließend für 15 Minuten bei 65°C inaktiviert. Im Anschluss hieran wurde die DNA noch einmal durch das Qiaex®-Kit der Firma Qiagen gereinigt.

3.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden die beiden Teile in 20µl mit 1µl Ligase im Puffersystem des Herstellers für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Ligase für 10 Minuten bei 6°C inaktiviert. Es wurde die T4-Ligase des Herstellers Fermentas verwendet. Für die Ligation wurde ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:1 bis 1:3 verwendet.

3.2.3.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegel

Zur Beurteilung der Größe von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde je nach Größe der DNA 0,7 bis 3% Agarose in TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Vor dem Gießen wurden 1-1,5 µl Ethidiumbromid in die Agarose gegeben. Nach ca. 30 min war das Gel fest. Der Gellauf erfolgte horizontal in 1x TAE-Puffer. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht beurteilt.

Materialien:

50xTAE: 242g Tris, 57,1ml Eisessig, 100ml 0,5M EDTA pH8,0, auf 1l mit Aqua destillata aufgefüllt.

TB-Puffer für Bromphenolblau-DNA-Marker: 90mM Tris (10,9g), 2,5mM EDTA (0,73g), 90mM Borsäure (5,6g) pH mit HCl auf 8,3 einstellen, auf 1l mit Aqua Destillata aufgefüllt.

Bromphenolblau für DNA: 25ml Ansatz: 60% Saccharose (15g), 0,025% Bromphenolblau (6,25mg) auf 25ml mit TB-Puffer pH8,3 aufgefüllt.

3.2.3.5 Isolation von DNA aus Agarosegel

Die Isolation von DNA aus Agarosegel erfolgte mit dem Qiaex-Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Um letzte Reste der Qiaex-II-Suspension zu entfernen, wurde die gewonnene DNA noch einmal für 30 Sekunden zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA wurde diese bei 260 nm und 280 nm photometrisch vermessen. Die DNA wurde im Verhältnis von 1:40 mit 10mM TrisHCl verdünnt, damit die optische Dichte im Messbereich des Photometers (0,1-0,9) lag. Eine optische Dichte von 1 bei 260nm entsprach einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Bei einem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm von 1,8 war die DNA sauber. Bei abweichenden Werten war sie mit Proteinen verunreinigt.

3.2.3.7 PCR

Für die PCR wurden pro Ansatz ca. 600ng Plasmid-DNA, oder bei rekombinanten PCRs das gesamte gereinigte Ergebnis der Vorgänger PCR, und jeweils 15pm des verwendeten Primers, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50µl mit je 1µl Taq der Firma Fermentas in dem TRIO Thermocycler der Firma Biometra ausgeführt. Als Reaktionspuffer diente der zur Taq gehörende Puffer der Firma Fermentas, zu dem MgCl₂ für eine Endkonzentration von 3mM und dNTPs mit jeweils 10mM sowie 0,1mg/ml BSA zugegeben wurden. Bei rekombinanten PCR Reaktionen wurden die Primer erst nach fünf Zyklen hinzugegeben. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Für die Megaprimer PCR wurde das TripleMaster PCR-System von der Firma Eppendorf verwendet.

3.2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz zur Überprüfung von neu generierten Klonen wurde aus Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Die Sequenzierung wurde als Cycle-Sequencing mit Hilfe des Thermo-Sequenase Kits der

Firma Amersham und des Sequenzier-Automaten LI-COR DNA-Sequencer Modell 4000L der Firma LI-COR durchgeführt. Einige der generierten Konstrukte wurden durch das Nano+Bio-Center der Technischen Universität Kaiserslautern sequenziert.

3.2.3.9 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Sequenzierkit RPN 2438 der Firma Amersham ausgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 600-800 ng der zu sequenzierenden Plasmid-DNA und je 0,5 µl der Sequenzierprimer Newiversal und Reverse (am 5'-Ende mit IRD 800 markiert) verwendet. Die Primer wurden zwischen 1:100 und 1:200 vorverdünnt. Pro Reaktion wurde 1µl des Reaktionsmixes eingesetzt, das gesamte Reaktionsvolumen betrug 4µl pro Ansatz. Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die nachfolgende PCR bestand nach einem initialen Schritt von 94°C für 2min aus 30 Zyklen mit je 94°C für 30 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden und 70°C für 30 Sekunden. Nach der PCR wurde zu den noch heißen Proben je 3µl Stopmix hinzugegeben. Die Proben wurden entweder sofort aufgetragen, oder bis zum Auftragen auf das Acrylamidgel auf Eis gestellt.

3.2.3.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wurden 21g (14,7g;6,3g) Harnstoff für ein 66cm Gel (41cm; 25cm Gel) in 31ml (19,6ml; 10ml) destilliertem Wasser und 5ml (3,5ml; 1,5ml) 10x TBE gelöst. Als nächstes wurden die Glasplatten durch Reinigen mit H₂O, 70% Ethanol noch einmal H₂O und Isopropanol vorbereitet. Nach nochmaligem Abwischen, um alle Staubreste zu entfernen, konnte der Gelträger zusammengebaut werden. Nun wurden zu dem gelösten Harnstoff 5,8ml (5,25ml; 3ml) Rapid Gel-XL-40%Conc und, um die Polymerisation zu starten, 350µl (245µl ;105µl) 10x APS und 50µl (35µl; 15µl) TEMED zugegeben. Das Gel wurde unter leichtem Ankippen gegossen. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bildeten, und ungleichmäßiges Laufen der Gelfront wurde durch Klopfen verhindert. Direkt nach dem Gießen wurde an der oberen Seite der Spacer eingesetzt und fest angedrückt, damit sich die Tasche gut ausbilden konnte. Das Gel wurde für mindestens 45 Minuten polymerisieren gelassen. Danach konnte der Spacer entfernt und die so entstandene Tasche von

Gelresten gereinigt werden. Auch die Glasplatten wurden von herausgelaufenen Gelresten gereinigt, dies ist besonders in dem Bereich, in dem der Laser liest, wichtig.

Nun konnte das Gel in den Sequenzer (Li-Cor 4000L) eingesetzt und der Vorlauf gestartet werden. Während des Vorlaufes erfolgte die Fokussierung des Lasers auf das Gel. Als das Gel die gewünschte Temperatur von 45°C bzw. 50°C erreicht hatte, konnten die Proben aufgetragen werden. Hierfür wurde die Tasche noch einmal mit Puffer durchgespült, und dann der Haifischzahnkamm eingesetzt. Es wurden jeweils ca. 1,4 µl Probe aufgetragen. Der Gellauf erfolgt über Nacht bei 45°C, 2200V, 25mA und 50W.

Materialien:

10xTBE long Range: 162,0g Tris (1340mM), 27,5g Borsäure (45mM), 9,3g Na-EDTA (25mM) auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

3.2.3.11 Auswertung

Zur Auswertung der Rohdaten wurde die Programmgruppe Base Image IR verwendet. Die weitere Auswertung erfolgte mit den Programmen EditSeq und Seqman aus dem Programmpaket Lasergene DNA-Star.

3.3 Arbeiten mit RNA

3.3.1 Allgemeines zum Arbeiten mit RNA

Um eine Kontamination von Lösungen oder Geräten mit RNAsen der Haut zu vermeiden wurden bei allen Versuchen Schutzhandschuhe aus Latex getragen.

3.3.2 Vorbehandlung von Geräten

Originalverpackte Einmalartikel wurden ohne Vorbehandlung verwendet; diese wurden jedoch separat von den sonst verwendeten Artikeln gelagert. Glasgeräte, die hohen Temperaturen standhalten, und bei denen eine Verunreinigung mit RNAsen nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden bei 180°C für 2h ausgebacken.

3.3.3 Umgang mit Chemikalien und Lösungen

Alle wässrigen und salzhaltigen Lösungen, die beim Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. Zu je 100 ml Lösung wurden 0,2 ml DEPC gegeben und gut geschüttelt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Lösung autoklaviert. Tris- und SDS-haltige Lösungen können nicht mit DEPC behandelt werden, und wurden daher mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Die hierbei verwendeten Chemikalien wurden dann nur in kleiner Menge bestellt, und nur für die RNA-Arbeiten verwendet. Organische Lösungen wie Ethanol und Isopropanol wurden unbehandelt eingesetzt.

3.3.4 *In-vitro*-Transkription und autokatalytische Spleißreaktion

3.3.4.1 Präparation der Template DNA

Als Erstes wurden 6µg Midiprep DNA eine Stunde mit Bam H I verdaut, um die DNA zu linearisieren. So war es möglich, bei der Transkription ein run-off-Transkript herzustellen. Dann wurde das Volumen auf 300µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgefüllt, und zweimal mit äquilibriertem Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert (gleiches Volumen zugeben, vortexen, 5 Minuten zentrifugieren, und dann vorsichtig die wässrige Phase abnehmen). Zum Fällern der DNA wurden 30µl 3M Natriumacetat mit pH 5-6 und 750µl 96%iges Ethanol zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation auf flüssigem N₂, und 20 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet an der Luft trocknen gelassen. Dieses wurde dann im 25 µl H₂O gelöst. Die Menge und Qualität der vorbereiteten DNA wurde über photometrische Vermessung und ein Agarosegel kontrolliert.

Materialien:

Restriktionsenzym *Bam* H I mit Puffer

äquilibriertes Phenol: Phenol mit Tris HCl pH 7,5 auf pH 7,0 äquilibriert

Chloroform, Natriumacetat, 96% Ethanol

3.3.4.2 *In-vitro*-Transkription zur Herstellung von pre-mRNA:

Zum Ansetzen der Transkriptionsreaktion wurden 10µl 5x Transkriptionspuffer, 10 µl rNTP Mix (jeweils 10mM A, C, G und U), 1µg verdaute Template DNA, Wasser (bis 46,5µl auffüllen), und zum Schluss 2µl Ribonuclease Inhibitor und 1,5 µl T7 RNA Polymerase gemischt, und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1µl DNase, RNase frei, wurde das Ganze noch einmal 15 Minuten bei 37°C stehen gelassen. Als Nächstes wurde 1µl 500mM EDTA, 20µl 3M Natriumacetat mit pH 5,2, 170µl TE 10/1 und 300µl Chloroform-Phenol(sauer)-Gemisch (1:1) zugefügt und nach vortexen für 10 Minuten zentrifugiert. Davon wurden 200µl des Überstandes entnommen. Durch Zugabe von 140µl Isopropanol und anschließendem, zwanzigminütigem zentrifugieren bei Raumtemperatur wurde die RNA gefällt und, nachdem sie getrocknet war, in 50µl H₂O aufgenommen.

Materialien:

Transkriptionsmix: 5xTranskriptionspuffer (Fermentas), rNTP Mix (je 10mM A, C, G und U), Ribonuclease Inhibitor (Fermentas), T7 RNA Polymerase (Fermentas)

DNase Verdau: DNase, RNase frei (Amersham Biotech)

500mM EDTA, 3M Natriumacetat (pH5,2), Isopropanol

TE 10/1: (10mM TrisHCL pH 8,0; 1mM EDTA)

Phenol Chloroform Gemisch: saures mit Wasser gesättigtes Phenol und Chloroform wurden zu gleichen Teilen gemischt

3.3.4.3 Spleißreaktion:

Um die zum Spleißen notwendigen Bedingungen herzustellen, wurden 20µl 500mM (NH₄)₂SO₄, 20µl 50mM MgCl₂ und 10µl HEPES mit pH 7,5 zu der RNA gegeben. Durch Zugabe von 1µl 10mM GTP startete die Spleißreaktion. Die Reaktion fand bei 37°C statt. Vor dem Starten der Reaktion und nach 2, 5, 10, 20, 60, 120, 180 und 240 Minuten wurde jeweils ein 10µl Aliquot entnommen und zu 10µl Auftragspuffer mit 20mM EDTA gegeben. Hierdurch wurde die Reaktion gestoppt. Die Probe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei -70°C gelagert.

Materialien:

Herstellen der Reaktionsbedingungen: 500mM Ammoniumsulfat, 50 mM Magnesiumchlorid, 500mM HEPES mit pH 7,5 und 10mM GTP

Auftragspuffer mit 20mM EDTA: 9,5ml Formamid; 12,5µl 20% SDS; 12,5mg Bromphenolblau; 12,5mg Xylencyanol FF; 400µl 500mM EDTA; 65 µl H₂O

3.3.5 cDNA-Synthese und RT-PCR

3.3.5.1 Vorbereiten der RNA

Für die cDNA-Synthese wurde zunächst, wie bei der *in-vitro*-Transkription beschrieben, RNA synthetisiert, und auch die Spleißreaktion lief identisch ab. Es wurden jedoch nur vor Reaktionsbeginn und nach zwei bzw. vier Stunden Proben entnommen. Diese Proben wurden jedoch nicht mit Auftragspuffer und EDTA gestoppt. Stattdessen wurde durch Zugabe von 1µl RNase-freier DNase und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C die letzten DNA-Reste verdaut, und dann 1µl 500mM EDTA, 20µl 3M Na-Acetat pH 5,2, 170µl TE 10/1 und 300µl Phenol-Chloroform-Gemisch zugegeben. Nach kurzem vortexen und zehninütiger Zentrifugation wurden 200µl Überstand abgenommen, mit 140µl Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt (durch 20min Zentrifugation), getrocknet, und in 50µl H₂O aufgenommen. Alternativ konnte auch mit dem Rneasy-Kit der Firma Qiagen RNA aus Bakterien isoliert werden (nach Angaben des Herstellers). Mit dieser RNA wurde dann genauso verfahren wie mit der *in vitro* synthetisierten, nachdem die Proben gezogen wurden. Hierbei wurden 5µg RNA eingesetzt.

Materialien:

Transkriptionsmix: 5xTranskriptionspuffer (Fermentas), rNTP Mix (je 10mM A, C, G und U), Ribonuclease Inhibitor (Fermentas), T7 RNA Polymerase (Fermentas)

DNase Verdau: DNase, RNase frei (Amersham Biotech)

500mM EDTA, 3M Natriumacetat (pH5,2)

TE 10/1: (10mM TrisHCl pH 8,0; 1mM EDTA)

Phenol Chloroform Gemisch: saures mit Wasser gesättigtes Phenol und Chloroform wurden zu gleichen Teilen gemischt.

3.3.5.2 Synthese der cDNA

12µl der gereinigten RNA wurden 5 Minuten bei 65°C inkubiert, kurz zentrifugiert, und 3 Minuten auf Eis gekühlt. Dann wurden 9µl cDNA-Mastermix hinzugegeben, der erst direkt vor Gebrauch angesetzt wurde. Der 1-fach-Ansatz besteht aus: 4µl 5x RT-Puffer; 1µl dNTP 10 mM, 1µl Hexanucleotide (100pmol/µl), 0,5µl 0,1M DTT, 1µl RNase Inhibitor, 1µl RT Superscript, und 0,5µl H₂O oder 1,5µl H₂O anstatt der RT-Superscript als Negativkontrolle. Nach Mischen und Zentrifugieren wurde 60 Minuten bei 37°C und danach 5 Minuten bei 95°C inkubiert, zentrifugiert und auf Eis schockgekühlt.

Materialien:

cDNA Mastermix: RT Puffer (Gibco), dNTPs (je 10mM A, C, G, T), Hexanucleotiden, DTT (Gibco), RNase Inhibitor (Fermentas), RT Superscript RNA abhängige DNA-Polymerase (Gibco)

3.3.5.3 PCR zur Amplifikation des zu untersuchenden Abschnittes

In die anschließende PCR zur Amplifikation des gesuchten Fragmentes wurden 4µl der cDNA eingesetzt. Die PCR wurde mit je 15pm des Primers und mit einer Unit *Taq* DNA-Polymerase in 50µl Gesamtvolumen in dem Standardreaktionsmix (Absatz 0) durchgeführt.

3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Polyacrylamidgel

3.3.6.1 Gießen des Gels

Um die RNA nach der Spleißreaktion darzustellen, wurde sie mit einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Zunächst wurden 16,8g Harnstoff in 18,6ml DEPC behandeltem Wasser und 4ml 10x TBE durch kurzes Erwärmen und Rühren gelöst.

Als Zweites wurde der Gelträger vorbereitet. Die Trägerplatte sowie die Nasenplatte wurden zuerst mit Wasser, dann mit 70% Ethanol und noch einmal mit Wasser gewaschen, und anschließend mit Isopropanol poliert. Nach nochmaligem Abwischen aller Staubkörnchen wurde der Gelträger aus den beiden Glasplatten und zwei Spacern zusammengebaut.

Zu dem gelösten Harnstoff wurden 0,4ml DMSO und 5,3ml Acrylamid gegeben und es wurde noch einmal gut gemischt. Durch Zugabe von 300 µl APS 10% und 40µl TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Das Gel wurde vertikal mit einer 25 ml Pipette gegossen. Danach wurde der Kamm eingesetzt und fixiert. Das Gel benötigte 20-30 min zur Polymerisation.

Materialien:

10x TBE Puffer: 121,1g Tris (Roth), 51,35g Borsäure (Roth), EDTA 3,72g (Roth) in 800ml DEPC behandeltem Wasser lösen und auf 1000ml auffüllen. Der pH-Wert beträgt ca. 8,3.

3.3.6.2 Elektrophoretische Auftrennung

Um eine Renaturierung der RNA zu verhindern, wurde der Gellauf bei 50°C durchgeführt. Hierfür standen ein Umwälzwasserbad und eine beheizbare Elektrophoresekammer der Firma Peqlab zur Verfügung. Vor dem Auftragen der Proben musste das Gel ca. eine Stunde bei 50°C vorlaufen. Als Laufpuffer diente 1X TBE. Bei einem Gel wurden 220 V und 25 mA eingestellt, wenn zwei Gele in einer Gelkammer laufen gelassen wurden, wurde die Stromstärke auf 35mA erhöht. Gegen Ende des Vorlaufes wurden je 4-6 µl RNA mit DEPC behandeltem Wasser auf 10µl aufgefüllt, und mit 10µl Loading Dye versetzt. Die Proben wurden nach 10 Minuten Inkubation bei 70°C mit einer Mikroliterspritze direkt aus dem Heizblock auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde mit denselben Einstellungen wie der Vorlauf durchgeführt, bis die untere grüne Farbmarkerbande ganz durchgelaufen war.

Materialien:

1x TBE Puffer: 10x TBE wird 1:10 mit sterilem bidestilliertem Wasser versetzt.

Auftragspuffer mit 20mM EDTA: 9,5ml Formamid; 12,5µl 20% SDS; 12,5mg Bromphenolblau; 12,5mg Xylencyanol FF; 400µl 500mM EDTA; 65 µl H₂O

3.3.6.3 Färben des Gels

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel mit 200ml 1x TBE und 50µl Etidiumbromid (10mg/ml) für 30 bis 40 Minuten gefärbt und ab und zu leicht bewegt. Danach wurde für 30 Minuten mit 200 ml 1x TBE entfärbt. Die RNA-Banden waren nun unter UV-Licht sichtbar.

3.3.7 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in Lösungen wurden diese mit H₂O so verdünnt, dass deren Extinktion (OD) bei 260nm in einem Bereich zwischen 0,2 und 0,8 lag. Eine OD von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40ng/μl (Sambrook et al., 1989). Die RNA-Konzentration errechnete sich aus der gemessenen Extinktion und dem jeweiligen Verdünnungsfaktor.

4 Ergebnisse

4.1 Die CdlSt1-0-Varianten als Ausgangsvariante zur Untersuchung der Mobilität des IStrons CdlSt1

Der Mechanismus der Mobilität des CdlSt1 ist von besonderer Bedeutung, da er sowohl die Häufigkeit des Springens des IStrons als auch den Ort der Integration maßgeblich bestimmt, ob es z.B. in einen ORF springt, dem Gen einer strukturellen RNA oder aber in nicht-kodierenden Regionen des Chromosoms. Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit konnten vier Arten des chimären genetischen Elements CdlSt1 gefunden werden: CdlSt1-0 (TlpA / TlpB), CdlSt1-I (Δ TlpA / TlpB), CdlSt1-II (TlpB), und CdlSt1-III (Δ TlpB) (Abb. 4.1). Alle CdlSt1-Varianten besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterscheiden sich aber in ihren IS-Element-Komponenten [185, 196]. Die CdlSt1-0-Varianten kodieren für zwei komplette transposase-like Proteine (TlpA und TlpB) und scheinen damit ein fast vollständiges IS-Element der IS605 Familie zu besitzen. Es ist davon auszugehen, dass die CdlSt1-0-Varianten, die im *C. difficile*-Stamm SE918 entdeckt wurden (CdlSt1a-SE918), der ursprünglichen Form des IStrons sehr nahekommen. Analysen der Sequenz und der Integrationsstellen mehrerer Varianten von CdlSt1-C34 zeigen, dass das IStron alle charakteristischen Merkmale eines IS605-Mechanismus besitzt [185, 197], wie z.B. dessen Mobilität. So kann davon ausgegangen werden, dass die IS-Element-Komponente die Ausbreitung von CdlSt1 vermittelt, während die Intron-Komponente für das effiziente Spleißen der mRNA-Vorläufer verantwortlich ist. Die Fusion des Gruppe-I-Introns mit dem IS-Element stellt dem IStron einen Mobilitätsmechanismus zur Verfügung, der auf die Verbreitung in prokaryonten Organismen spezialisiert ist [232]. Dabei wird angenommen, dass der Mobilitätsmechanismus ursächlich dafür verantwortlich ist, dass CdlSt1 ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C. difficile*-Genom integriert [185]. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit aus. Basierend auf der IStron Typ-0-Variante sollte ein Modellsystem etabliert werden, mittels dessen der Mechanismus und die Strukturen, welche die Mobilität des IStrons vermitteln, charakterisiert werden können. Die Mobilität des chimären IStrons könnte theoretisch von jedem der beiden Elemente, des Gruppe-I-Introns oder auch des IS-Elements, bewirkt werden.

Abb. 4.1

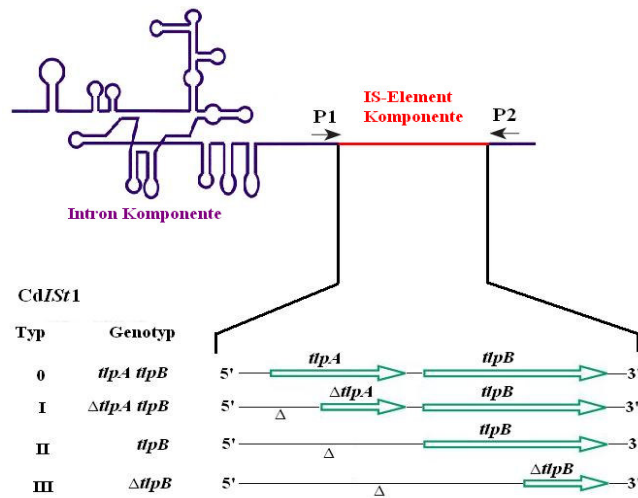


Abb.4.1 Schematische Darstellung der IStron Varianten *CdlSt1* Typen 0 bis III
 Die vier dargestellten *CdlSt1* Varianten bestehen jeweils aus einer Intron Komponente und einem Insertionselement; während die Intron-Komponente (oberer Teil) nur geringe Unterschiede aufweist, variieren die IS-Element-Komponente (unterer Teil) stärker; alle Varianten haben konservierte Ribozym Aktivitäten; bis auf Typ 0 finden sich in allen Varianten Deletionen der putativen TlpA und TlpB Proteine; P1 (5'-CGACAACCTCAAAAATGATAAA-3") und P2 (5'-TCTTAATCCTTCTTTAAT-ATATTT-3") geben die Primer für die PCR Amplifikation der vier IStron Arten wieder (modifiziert nach Hasselmayer et al 2004 [196]).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die für eine Analyse des Mechanismus der Mobilität nötigen Konstrukte zu generieren und deren Funktionalität nachzuweisen. Und die Untersuchung von *L. innocua* als möglicher Model-Organismus.

Als erster Schritt musste in das IStron ein geeignetes Markergen eingeführt werden, das zur Selektion von neu generierten Klonen genutzt werden konnte. Als Resistenzmarker zur Selektion wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *catP* (Chloramphenicolacetyltransferase) aus *C. perfringens* ausgewählt. Im Rahmen der Aufnahme eines Selektionsmarkers war es wichtig, dass die Integration des *catP*-Gens in das IStron dessen Funktionalität nicht störte, insbesondere, dass die Intron-Komponente nicht maßgeblich beeinflusst wurde. Bei Gruppe-I-Introns wurden bei der Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur konservierte, für den Spleißprozess notwendige Nukleotide oder Nukleotid-Abfolgen in exakt definierte Positionen angeordnet. Die exakte Positionierung war die Voraussetzungen zum Aufbau der für die Katalyse notwendigen Tertiärstruktur des Introns [163]. Neben dem katalytischen Kern (Domänen P3-P8) existieren weniger stark konservierte periphere Domänen (P1,

P2 und P9), die optional offene Leseraster (ORF) enthalten können. Diese ORFs kodieren entweder für Maturasen oder Endonukleasen, die am Spleißprozess beteiligt sind und dem Intron die Mobilität ermöglichen [176, 184]. Als Zielstruktur für die Integration des *catP*-Gens schienen daher insbesondere die peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 geeignet, da die Integration des *catP*-Gens in diesen Loops die Struktur und Stabilität des IStrons nicht negativ beeinflussen sollte.

Ein weiterer Punkt der beachtet werden sollte war, dass die Untersuchungen zur Mobilität des IStrons nicht in *C. difficile* durchgeführt werden konnten, da in allen bisher untersuchten *C. difficile*-Stämmen zumindest eine Kopie des IStrons gefunden worden war [185]. Die Wahl fiel auf den apathogenen Keim *Listeria innocua*, da er ein ähnliches Codon-Usage wie *C. difficile* besitzt, so dass die beiden IStron kodierten, potentielle Transposasen *TlpA* und *TlpB* in *L. innocua* exprimiert werden sollten. Ein weiterer Grund für die Wahl von *L. innocua* als Modell-Organismus lag darin, dass für diesen Keim mit dem Suizidplasmid pAUL-A, ein Derivat der pE194-Familie von Suizidplasmiden, mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori) verfügbar ist [233]. Dieser Vektor enthält sowohl Regulationssequenzen für gram(+)-Bakterien als auch für *E. coli* [233]. Bei Nutzung dieses Vektors konnten die Klonierungsschritte in *E. coli* durchgeführt werden, womit sich die Klonierungsschritte wesentlich vereinfachen ließen. Um die Voraussetzungen für die Transkription in *L. innocua* zu schaffen, musste ein für gram(+)-Bakterien geeigneter Promotor ausgewählt werden. Hierfür bot sich der p23-Promotor an, der in derselben Orientierung zum IStron-Konstrukt einzufügen war. Für alle Konstrukte mussten ferner geeignete Negativkontrollen generiert werden, die entweder nur eine der beiden Transposasen-Gene, *tlpA* und *tlpB*, oder keines dieser beiden Gene enthalten sollten. Da die IStron-Typ-III-Variante mit Deletion $\Delta tlpB$ als spleißaktiv vorbeschrieben war, wählten wir diesen Typ III als Negativ-Kontrolle für die potentielle Transposase-Aktivitäten.

4.2 Generierung der IStron-*catP*-Konstrukte

Im ersten Schritt wurde in das IStron das Markergen *catP* (Chloramphenicolacetyltransferase) aus *C. perfringens* eingeführt. Als Zielstrukturen

für die Integration des catP- Gens wurden die peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 genutzt.

4.2.1 Entfernung des Stop-Codons und Einführen einer NcoI-Restriktionsschnittstelle in P2- und P9.1-Stem-Loop des Typ-0-Istrons CdlSt1a-SE918

Mit einer rekombinanten/asymmetrischen PCR wurde zunächst aus dem Typ-0-Istron des C.-difficile-Stamms SE918 ein Stop-Codon entfernt, das bei nt 40 in tlpA liegt (TAA sollte zu →GAA mutiert werden). Dazu wurden in einer ersten PCR aus chromosomaler DNA mit den Primerpaaren Pseudosyn1 und 3`-1T (mit Punktmutation um das Stop-Codon zu entfernen) bzw. Pseudosyn2 und 5`-2T (analog zu 3`-1T) zwei Teilfragmente generiert. Diese wurden über ein Agarose-Gel extrahiert (QIAEX II) und anschließend in einer zweiten asymmetrischen PCR eingesetzt, um das IStron ohne Stop-Codon zu generieren. Das so veränderte IStron wurde dem TA-Cloning zugeführt und die neuen Konstrukte anschließend sequenziert. Es wurden mutationsfreie Klone ausgewählt, um damit die nachfolgenden genetischen Veränderungen zu erarbeiten. Der pCR2.1-TOPO-Vektor diente als Grundgerüst für die weiteren Arbeiten. Er kodiert sowohl für eine Ampicillin-, als auch über eine Kanamycin-Resistenz und verfügt weiterhin über ein LacZ α -Komplement, das beim Einsatz von X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion der Folgeklone genutzt werden konnte (Nachweis der erfolgreichen Insertionsinaktivierung des lacZ-Gens). Unter Nutzung des T7-Promotors des Vektors war ferner der Einsatz von in-vitro-Transkription möglich.

Vorbereitend wurden in P2- und P9.1-Loop jeweils eine NcoI-Schnittstelle als spätere Klonierungsstelle für das catP-Gen eingefügt (siehe Abb.4.2 A (P2), 4.2B (P9.1)).

Für das weitere Vorgehen war die Orientierung des IStron im pCR2.1-TOPO-Vektor wichtig. Das IStron sollte in Sense-Orientierung zum T7-Promotor vorliegen. Es hatte sich gezeigt, dass das IStron bei Antisense-Orientierung in Bezug auf den T7-Promotor des pCR2.1 keine regulären Spleißprodukte generiert. Solche Antisense-Orientierungen wurden im Folgenden als Negativ-Kontrollen für die reguläre Aktivität des Istrons eingesetzt. Zur Bestimmung der jeweiligen Orientierung wurden HindIII- bzw. NcoI-Restriktionen ausgeführt. Der HindIII-Verdau sollte die folgenden zwei Fragmente erzeugen: Sense-Orientierung = 1394nt und 5024nt; Antisense = 1213nt und 5205nt. Die Fragmentgrößen bei NcoI-Verdau berechneten sich wie folgt:

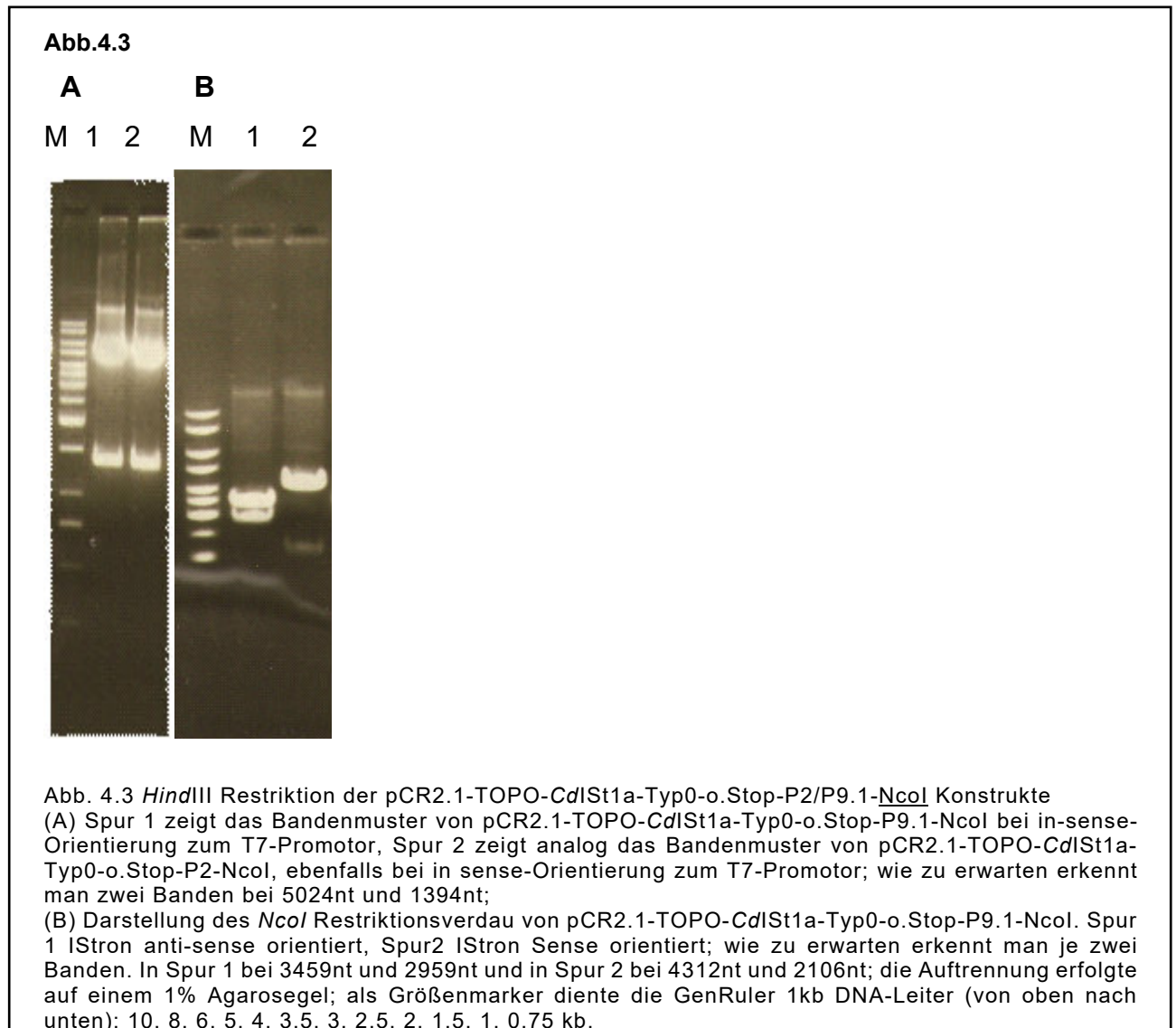
Integration in P2: in Sense = 1772nt und 4646nt; Antisense = 3793nt und 2625nt;
Integration in P9.1: in Sense = 2106nt und 4312nt; Antisense 3459nt und 2959nt.

Abb. 4.2



Abb. 4.2 Sekundärstrukturen des Zielkonstrukts: IStron *CdIst1a-SE918-P2/P9.1-NcoI* ohne Stop Als Zielstruktur für die Integration der *catP*-Genen wurden die peripheren Stem-Loop-Struktur P2- und P9.1 gewählt (siehe Text); mit diesem Ziel wurde eine *NcoI*-Schnittstelle in P2- (A) und in P9.1 (B) eingeführt; die zu dem Intron gehörenden Nukleotide sind in Großbuchstaben dargestellt, zum Exon gehörende Nukleotide in Kleinbuchstaben; für Gruppe I Introns sind stark konservierte Nukleotide beschrieben, in der vorliegenden Abbildung sind sie mit Großbuchstaben gekennzeichnet; die charakteristischen Nukleotidpaarungen sind als P1-P9 bezeichnet; die 5' Spleißstelle ist im P1-Pairing enthalten, es handelt sich um das stark konservierte Uridin-GuanosinNukleotidpaar (u-G); die Internal Guide Sequence (IGS) beinhaltet auch Sequenzen des 5'-Exons; die Domänen P4-P6 und P3-P7-P8 bilden das katalytische Zentrum von Gruppe-I-Introns aus; bei den P-, Q-, R- und S-Sequenzen handelt es sich um konservierte Regionen des katalytischen Zentrums; 3' des P9.2-Pairings befinden sich zwei ORFs, die für die potentiellen Transposasen *TlpA* und *TlpB* kodieren (modifiziert nach Braun et al 2000 [185]).

Die Abbildung 4.3 A-B zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Verdau.



4.2.2 Funktionelle Analyse der *Nco*I-P2 und *Nco*I-P9.1 IStron-Konstrukte

Die Frage, die es als nächstes zu klären galt, war, inwieweit die eingeführte *Nco*I-Restriktionsschnittstelle in P2- bzw. P9.1-Stem-Loop das Spleißverhalten des IStrons beeinflusst. Zur Untersuchung der Spleißaktivität der neu generierten Konstrukte wurde die Methode der RT-PCR eingesetzt. Da der Spleißvorgang auf Ebene der RNA abläuft, wurde über in-vitro-Transkription und autokatalytisches Spleißen generierte RNA zur cDNA-Synthese verwendet und die so erzeugte DNA als Template zur PCR-Amplifikation mit den Primern Pseudosyn1 und Pseudosyn2 eingesetzt. Für die IStron-Konstrukte mit *Nco*I-Schnittstelle in P2- und P9.1-Loop konnten über die RT-PCR die gespleißten Produkte generiert werden. Man erkannte

Banden bei 293bp, der vorhergesagten Größe des ligierten Exons (Abb.4.4 zeigt das Ergebnis).

Abb. 4.4

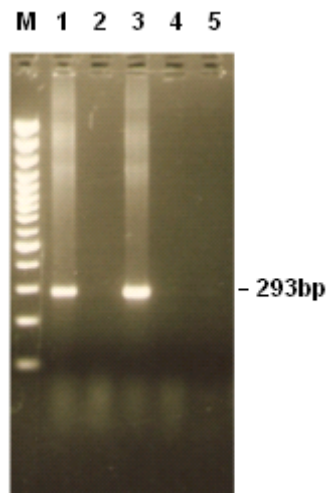


Abb.4.4 Nachweis des Spleißens pCR2.1-TOPO-CdIst1a-Typ0-o.Stop-P2/P9.1-NcoI Konstrukte Dargestellt ist der Spleißerfolg über RT-PCR der neu generierten pCR2.1-IStrom-Konstrukte ohne Stop-Codon bei zusätzlich eingeführter NcoI-Schnittstelle in P2 (Spur 1) bzw. im P9.1 Loop (Spur 3); als Primer dienten Pseudosyn1 und Pseudosyn2; als Template wurde cDNA eingesetzt (Spuren 1 und 3 mit Primern und Reverse Transkriptase; Spuren 2 und 4, Kontrollen mit Primern aber ohne Reverse Transkriptase); als Negativkontrolle Wasser statt cDNA in Spur 5; bei der cDNA Kontrolle wurde das Enzym Reverse Transkriptase nicht dem Reaktionsansatz zugesetzt; das Fehlen von Amplifikaten in den Spuren 2 und 4 beweist, dass die Banden in Spur 1 und 3 auf gespleißte RNA und nicht auf mögliche DNA-Kontaminationen zurückzuführen sind; die Auftrennung erfolgte auf einem 2% Agarosegel; als Größenmarker diente die GeneRuler 100bp Ladder Plus DNA-Leiter (von oben nach unten): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

Zusätzlich durchgeführte Sequenzierungen der in pCR2.1 klonierten RT-PCR Produkte (Abb. 4.5) bewiesen, dass es sich um reguläre Spleißprodukte handelte, so dass man davon ausgehen konnte, dass die eingeführte NcoI-Schnittstelle (in P.2 oder P.9.1) keinen Einfluss auf die Spleißaktivität des IStroms ausübt

Abb. 4.5

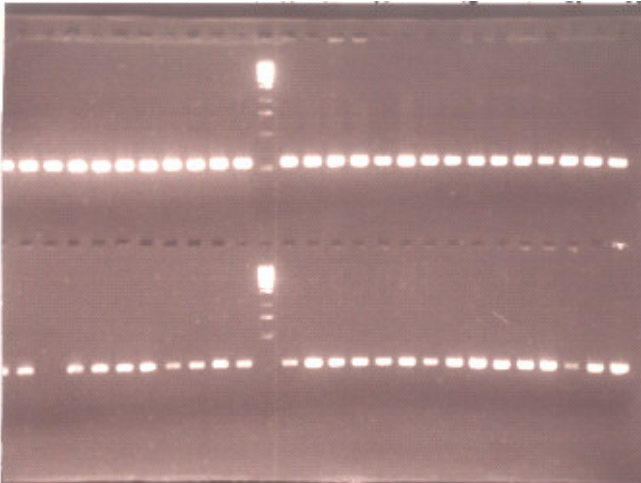


Abb. 4.5 In pCR2.1 klonierte RT-PCR Produkte
Als Primer wurden Pseudosyn1 und Pseudosyn2 verwendet; bei ca. 293bp sind Banden zu erkennen, die dem Sollspleißprodukt entsprechen; die Auftrennung erfolgte auf einem 3% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0,25kb.

Es konnte gezeigt werden, dass die Spleißreaktion des nativen Typ-0-Istrons deutlich langsamer abläuft, als es etwa bei den Typ-I- oder Typ-II-Istrons der Fall ist. Daher sollte nun die Spleißkinetik der neu generierten „NcoI-Konstrukte“ untersucht werden. Dazu wurde aus den Klonen zunächst DNA isoliert, die als Template für die RNA-Synthese diente. Um die Ergebnisse beurteilen zu können, musste die Länge der RNA-Moleküle bekannt und bei allen Molekülen identisch sein. Mit diesem Ziel wurde eine Linearisierung des Plasmides mit BamHI vorgenommen, so dass bei der folgenden in-vitro-Transkription ein Run-off-Transkript mit definierter Länge entstand. Die RNA-Synthese erfolgte durch T7-RNA-Polymerase vom T7-Transkriptionsstart bis zum Kettenende an der BamHI-Schnittstelle. Derart gewonnene RNA wurde angereichert und die Spleißreaktion durch Zugabe von GTP gestartet. GTP wird durch die GTP-Bindungsstelle gebunden/koordiniert und wirkt beim Spleißen im ersten Transesterifizierungsreaktion als Nukleophil.

Nach 0, 2, 5, 10, 20, 60, 120, 180, und 240 Minuten wurden jeweils 10 µl des Reaktionsgemisches entnommen, und die Reaktion durch Zusatz von EDTA, welches benötigte zweiwertige Ionen abfängt, beendet. Nach Denaturierung der RNA erfolgte die Analyse der so gewonnenen RNA-Fragmente in der Polyacrylamid-

Gel-Elektrophorese. Die Elektrophorese wurde bei 50°C durchgeführt, um sekundäre Wechselwirkungen (Ausbildung von Stems und Loops der RNA intramolekularer Hybridisierung) zu verhindern. Abschließend wurde die RNA durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

Als Richtschnur für die Beurteilung der Reaktionsgeschwindigkeit dient der hälftige Umsatz des Eduktes. In dem Fall war erst nach 60 Minuten ein erstes Spleißprodukt zu erkennen. Die Spleißreaktion wird von der nativen Typ-0-Variante ausgeführt, ist aber auch im Fall der neuen „NcoI-Konstrukte“ stark verlangsamt. Demnach haben die NcoI-Schnittstellen weder im P2- noch im P9.1-Loop einen bedeutenden Einfluss auf die Spleißaktivität.

Aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit Typ-II-Varianten, in denen die Transposase TlpA fehlte, ging hervor, dass für die Mobilität von CdiSt1 nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Scheinbar werden mit der Deletion von TlpA eher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. In Typ-II-Varianten erfolgt das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0-Pairing dann aber über eine geringere Distanz, verbunden mit der Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur. Anhand dieser Ausführungen kann vermutet werden, dass das chimäre CdiSt1 ein evolutionsgeschichtlich jüngerer genetischer Element ist und die Typ-0-Variante mit den komplett erhaltenen Genen tlpA und tlpB die ursprüngliche IStron-Variante darstellen sollte. Schnellere Spleißreaktion, verbunden mit der Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur, böten im Vergleich zu den stark verlangsamt Spleißreaktionen im Fall der Typ-0-Variante Selektionsvorteile für die verkürzten CdiSt1.

4.2.3 Umklonierung des IStrons in den pTZ19R-Vektor

Da der pCR2.1-TOPO-Vektor selbst bereits über eine NcoI-Schnittstelle verfügt und die neu eingeführten NcoI-Schnittstellen zur Klonierung des catP-Gen in das IStron genutzt werden sollten, müssten die neuen IStron-Konstrukte in ein geeignetes Plasmid umklonieren, das als Grundgerüst für die weiteren Arbeitsschritte dienen konnte. Als geeigneter Vektor wurde pTZ19R ausgewählt. pTZ19R enthält ein β -

Lactamasegen, dass nach Transformation für die Ampicillinresistenz sorgt, die zur Selektion auf die Zielprodukte eingesetzt werden sollte. Die pMB1-rep-Region dient der Replikation des Plasmids. Außerdem beinhaltet das Plasmid pTZ19R das *E. coli* Operon LacZ, das bei Gegenwart von X-Gal zu einer Blau-Weiß-Selektion der Kolonien eingesetzt werden kann. In den Ziel-Konstrukten bewirkt die Insertionsinaktivierung des LacZ eine Weißfärbung der Zielkolonien. Zur Umklonierung wurde das IStron über einen BamHI-XbaI-Doppelverdau aus dem pCR2.1-TOPO-Plasmid mobilisiert und an entsprechender Stelle in das pTZ19R-Plasmid inkloniert (Abb. 4.6 A, B, C).

Das Plasmid wurde in *E. coli* Top 10 transformiert und auf LBamp-Platten selektioniert. Die gewachsenen weißen Klone wurden via IStron-PCR mit den Primerpaaren Pseudosyn1 und Pseudosyn2 analysiert und durch Kontrollverdau bestätigt (Abb. 4.7 A, B). Durch Sequenzierung wurden mutationsfrei Klone identifiziert, mit denen weitergearbeitet wurde.

Auch alle weiter unten generierten Mutanten wurden auf diese Weise hergestellt und durch Sequenzierung überprüft. Die Plasmide pTZ19R-MCS-TOPO-CdISt1a-SE918-P2- bzw. P9.1-NcoI ohne Stop-Codon wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als pMO-1 bezeichnet und um P2 von P9.1 Loop zu unterscheiden als pP2MO-1 und pP9.1MO-1 klassifiziert.

Abb. 4.6

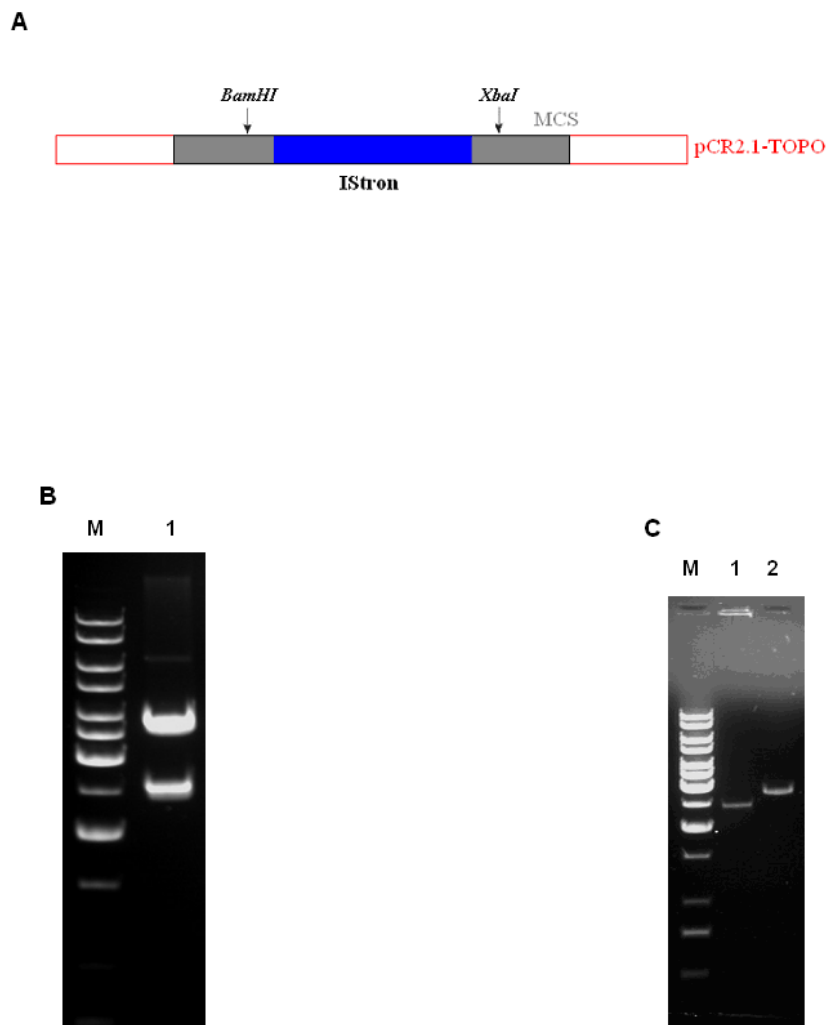


Abb. 4.6 Darstellung und Kontrollverdaus des MCS-TOPO-Konstrukts mit integriertem IStron
(A) Schematische Darstellung der MCS-TOPO mit IStron und den singulären Restriktionsschnittstellen BamHI und XbaI, über die das IStron mobilisiert wurde; (B) Ergebnis des BamHI-XbaI-Doppelverdaus zur Mobilisierung des Typ0 IStrons aus dem pCR2.1-TOPO-Vektors (hier im exemplarisch das P9.1-Konstrukt); Spur 1 zeigt das IStron einschließlich des Vektor-Anteils, der nach BamHI-XbaI-Doppelverdau am IStron verbleibt bei 2500nt und den pCR2.1-TOPO-Vektor bei ca. 3805nt; (C) zeigt die aus dem Agarosegel isolierten Einzelfragmente, Spur 1 das IStron, Spur 2 das über BamHI und XbaI doppelverdaute pTZ19R-Plasmid, in das das IStron inklonieren worden war; die Auftrennung erfolgt auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75kb.

Es konnte gezeigt werden, dass das IStron in Antisense-Orientierung zum T7-Promotor des pCR2.1 keine regulären Spleißprodukte generiert. Daher eigneten sich die Antisense-Orientierungen als Negativ-Kontrollen zum Nachweis der regulären Spleißaktivität des IStrons. Mit dieser Zielsetzung wurden auch die antisense-Konstrukte in pTZ19R erzeugt und isoliert. Antisense-Konstrukte werden als pP2MO1(-) und pP9.1MO1(-) bezeichnet.

Abb. 4.7

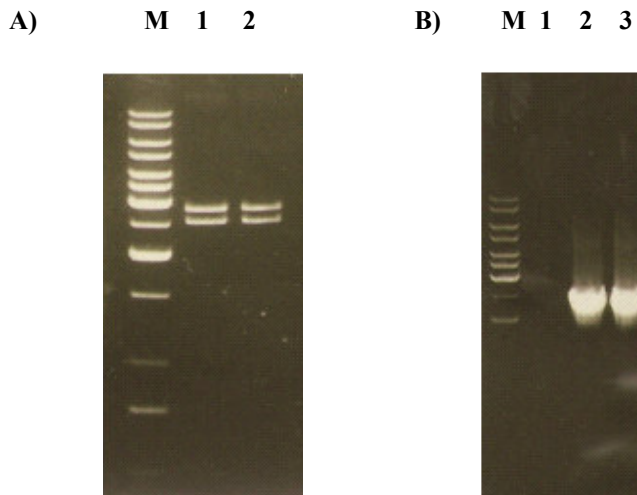


Abb. 4.7 Nachweis der erfolgreichen IStron-Integration im Plasmid pMO1

(A) Nachweis des IStrons im pTZ19R-Plasmid nach BamHI-XbaI-Doppelverdau: Spur 1 und 2 zeigen bei 2500nt das IStron mit der in P2 bzw. P9.1 eingeführten NcoI-Restriktionsschnittstelle (bewiesen durch Sequenzierung) und bei 2862nt das pTZ19R-Plasmid. (B) Klon-PCR-Nachweis der erfolgreichen Integration des IStrons in das pTZ19R-Plasmid; Spur 1 Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne gepickte Kolonie), Spur 2 und 3 Kolonien, die in das Plasmid pTZ19R das IStron integriert haben; die Auftrennung erfolgte über einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GenRuler 1kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75kb.

4.2.4 Einführen der *catP*-Box in P2- und P9.1 des Typ 0 IStron

Die Plasmide pMO-1 und pMO-1(-) verfügen über die in P2- und P9.1-Loop eingeführte singuläre NcoI-Restriktionsschnittstelle, so dass über diese nun das *catP*-Gen eingeführt werden konnte. Die *catP*-Box besteht aus dem *catP*-Gen samt seinem Promotor. Zur Mobilisierung der *catP*-Box stand in unserem Arbeitskreis ein modifiziertes pUC-Plasmid, pUC-P9.1/neg.*catP* (Abb. 4.8) zur Verfügung, aus dem die Box nach NcoI-Restriktionsverdau herausgeschnitten werden konnte, um sie dann in die ebenfalls NcoI-verdauten Plasmide pMO-1 und pMO-1(-) zu ligieren. Die resultierenden Plasmide wurden in *E. coli* Top10 transformiert und auf LBamp-Platten selektioniert. Gewachsene Kolonien wurden via PCR mit dem Primerpaar *catP*3 und *catP*4 auf die Integration der *catP*-Box in P2- und P9.1-Loop hin untersucht (Abb. 4.9A). Das resultierende Plasmid wurde als pMO-2 und pMO-2(-) (im Falle des in Antisense orientierten IStrons) bezeichnet. Ein NcoI-Restriktionsverdau vom Plasmid pMO-2/-2(-) bewies die Integration des *catP*-Gens (Abb. 4.9 B). Da das *catP*-Gen über

eine singuläre NcoI-Schnittstelle in pMO-1 und pMO-1(-) ligiert worden war, lag catP in Sense und Antisense-Orientierung zum T7-Promotor vor. Aus der Kombination der Orientierungen und den Integrationsorten P2 und P9.1 ergeben sich 8 Konstrukte, die alle isoliert, charakterisiert und bestätigt wurden. Es handelte sich im Einzelnen um folgende Konstrukte in pMO-1: IStron(+)-P2catP+, IStron(+)-P2catP-, IStron(-)-P2catP+, IStron(-)-catP-, IStron(+)-P9.1catP+, IStron(+)-P9.1catP-, IStron(-)-P9.1catP+, IStron(-)-P9.1catP-. Dabei geben IStron(+/-) und catP +/- die Orientierung an.

Abb. 4.8

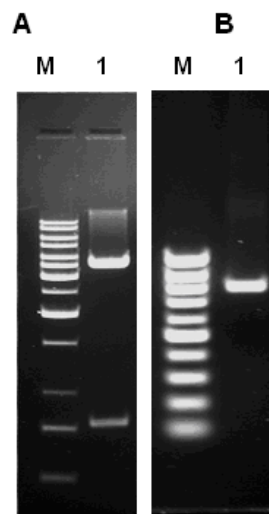


Abb. 4.8 Mobilisierung des catP-Gens aus pUC-P9.1/neg.catP durch NcoI-Restriktion
 (A) Spur 1 zeigt zwei Banden, die obere Bande entspricht dem modifizierten pUC-Vektor ohne catP die zweite untere Bande mit einer Größe von 790bp entspricht dem catP-Gen; die Auftrennung erfolgt auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker dient die GeneRuler 1kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75kb.
 (B) Darstellung des aus dem Plasmid pUC-P9.1/neg.catP isoliertem catP-Gen; die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel; als Größenmarker diente die GeneRuler 100bp DNA-Leiter (von oben nach unten): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

Abb. 4.9

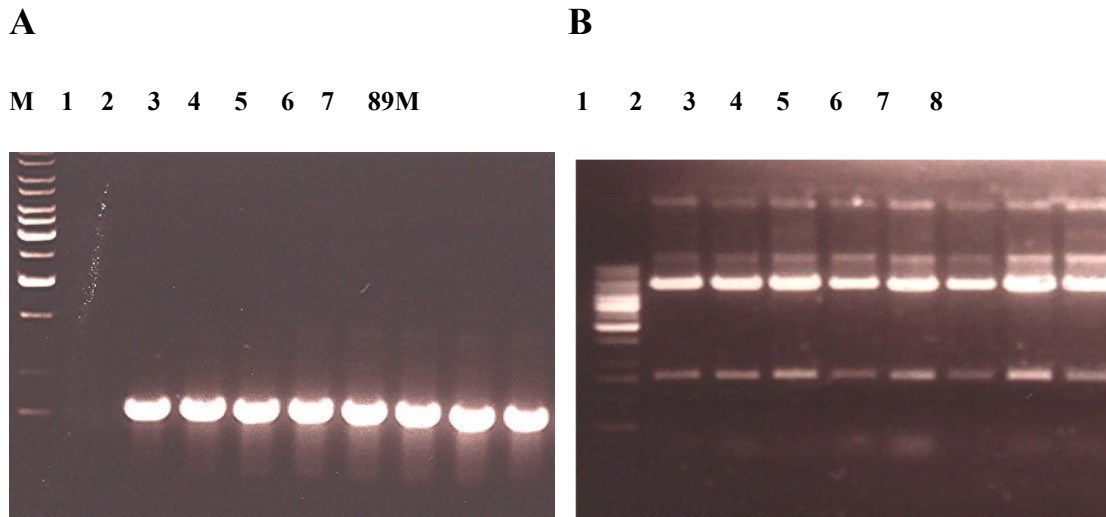


Abb. 4.9 PCR-Nachweis der Integration des *catP*-Gens in pMO-1/-1(-).

(A) Spur 1 Negativkontrolle; Spur 2-9 das durch das Primerpaar CatP3 und CatP4 amplifizierte *catP*-Gen bei ca.790bp in den Konstrukten IStron(+)-P2*catP*+, IStron(+)-P2*catP*-, IStron(-)-P2*catP*+, IStron(-)-*catP*-, IStron(+)-P9.1*catP*+, IStron(+)-P9.1*catP*-, IStron(-)-P9.1*catP*+, IStron(-)-P9.1*catP*-. Die Auftrennung erfolgte über einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 100bp-DNA-Leiter(von oben nach unten): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

(B) *Nco*I-Restriktionsverdau vom Plasmid pP2MO-2 und pP9.1MO-2 mit den verschiedenen Konstrukten zur Verifizierung des *catP*-Gens. Man sieht zwei Banden: bei ca.5456bp, was dem linearisierten Plasmid pP2MO-1 und P9.1MO-1 entspricht und bei ca.790bp, was dem *catP*-Gen entspricht. Die Auftrennung erfolgte über einen 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1kb-DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25kb.

Da das *catP*-Gen über eine singuläre *Nco*I-Schnittstelle in pMO-1 und pMO-1(-) ligiert worden war, konnte das *catP* in Sense und Antisense-Orientierung vorliegen. Für die weiteren Arbeiten waren beide Orientierungen des *catP*-Gens wichtig, da es sich bei den Sense-/Antisense-Paaren jeweils um die funktionell aktive und die inaktive Form des Konstrukts handeln sollte. Zur Bestimmung der Orientierung des *catP*-Gens, eignete sich ein *Bam*HI-*Eco*RV-Doppelverdau. Dabei entstanden jeweils drei Banden. Für die Integration des *catP*-Gens im IStron(+)-P9.1 entstanden im Falle der Sense-Orientierung Banden bei 2893, 2508, 845bp und in Antisense-Orientierung bei 2893, 2216, 1137bp (Abb. 4.10). Für IStron(+)-P2 Konstrukte entstanden im Falle der Sense-Orientierung Banden bei 2893, 2842, 511bp und in Antisense-Orientierung bei 2893, 2550, 803bp (Abb. 4.10).

Abb. 4.10

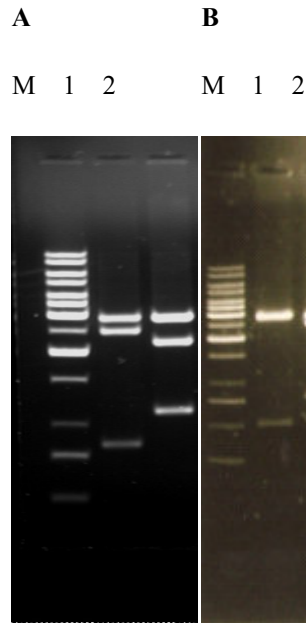


Abb. 4.10 pMO mit catP-Gen in P9.1-Loop oder P2-Loop

Nach BamHI-EcoRV-Doppelverdau der Konstrukte generiertes Bandenmusters: (A) Spur 1: pMO-2 mit catP-Gen in P9.1-Loop in sense-Orientierung zum T7-Promotor; Spur 2: pMO-2 mit catP-Gen in P9.1-Loop in Antisense-Orientierung zum T7-Promotor. (B) Analog dazu die Integration in P2-Loop; die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel; als Größenmarker diente der GeneRuler 1kb-DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25kb.

4.2.5 Generierung und Einklonieren des p23-Promotors

Mit den Plasmid pMO-2 und pMO-2(-) und den verschiedenen Typ-0-Konstrukten [IStrom(+)-P2catP(+), IStrom(+)-P2catP-, IStrom(-)-P2catP+, IStrom(-)-catP-, IStrom(+)-P9.1catP(+), IStrom(+)-P9.1catP-, IStrom(-)-P9.1catP(+), IStrom(-)-P9.1catP(-)] waren zu diesem Zeitpunkt Konstrukte mit modifizierten IStroms generiert worden, auf welche mit Hilfe des integrierten catP-Gens (in P2- und P9.1-Loop) selektioniert werden konnte. Weiter oben wurde bereits darauf verwiesen, dass in allen untersuchten *C. difficile*-Stämmen zumindest eine Kopie des IStroms enthalten ist, so dass die vorgesehenen Untersuchungen zur Mobilität des IStroms nicht in *C. difficile* durchgeführt werden konnten. Alternativ wurde daher der apathogene Keim *Listeria innocua* ausgewählt, der ein ähnliches Codon-Usage wie *C. difficile* besitzt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die beiden IStrom kodierten, und potentielle Transposasen TlpA und TlpB in *L. innocua* exprimiert werden würden. Ein weiterer Grund für die Wahl von *L. innocua* als Modell-Organismus war, dass für diesen Keim

ein Suizidplasmid pAUL-A, ein Derivat der pE194 Familie von Suizidplasmiden mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori), verfügbar war [233]. pAUL-A enthält sowohl Regulationssequenzen für gram(+)-Bakterien als auch für *E. coli* [233], so dass alle zugrunde liegenden Klonierungen in *E. coli* vorgenommen werden konnten.

Für die Transkription von Genen in *L. innocua* musste ein für gram(+)-Bakterien geeigneter Promotor inkloniert werden. Hierfür schien der p23-Promotor geeignet, welcher via Sall- und XbaI-Restriktionsschnittstellen in selber „Sense-Orientierung“ zum IStron-Konstrukt eingefügt werden sollte. Das Plasmid pLATO-Rep-p23 besitzt einen p23-Promotor, der durch eine 3'-Sall-Restriktionsschnittstelle flankiert wird, allerdings nicht durch eine XbaI-Restriktionsschnittstelle. Über rekombinante PCR unter Verwendung der Primer Sall-p23 und p23-XbaI wurde das 3'-Ende der Sall-Restriktionsschnittstelle in eine XbaI-Schnittstelle umgewandelt und am 5'-Ende die Sall-Restriktionsschnittstelle zu erhalten (Abb. 4.11). Im resultierenden PCR-Amplifikat wurde so ein p23-Promotor erzeugt, der von Sall- und XbaI-Restriktionsschnittstellen flankiert wurde. Anschließend wurde der p23-Promotor durch Sall-XbaI-Doppel mobilisiert und entsprechend über „Forced Cloning“ in die Varianten der Plasmide pMO-2 und pMO-2(-) ligiert. (Abb. 4.11; Abb. 4.12 A, B). Die derart auf der Basis von pMO-2 und pMO-2(-) generierten Plasmide mit dem in Serie vorgeschalteten p23-Promotor wurde als pMO-3 bezeichnet. Bei pMO-3(-) handelt es sich erneut um Antisense-orientierte IStron-Konstrukte (Abb. 4.13).

Abb. 4.11

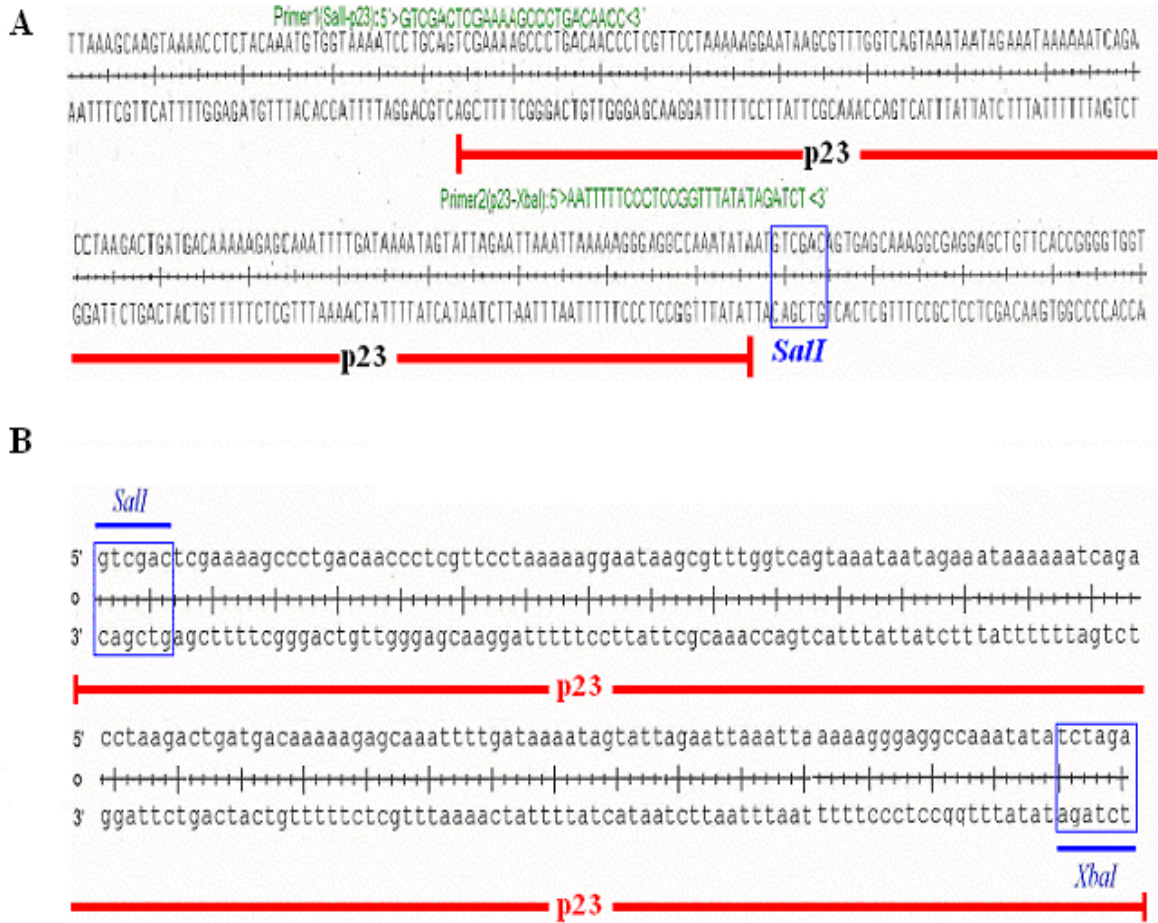


Abb. 4.11 Anpassung des p23-Promotors im Plasmid pLATO-rep-p23.

(A) Die Primer Sall-p23 und p23-XbaI sind grün dargestellt; die Sall-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende wurde via PCR in eine XbaI-Schnittstelle umgewandelt und am 5'-Ende eine Sall-Schnittstelle generiert; (B) DNA-Sequenz des resultierenden p23-Promotors mit einer am 5'-Ende gelegenen Sall-Restriktionsschnittstelle und einer am 3'-Ende gelegenen XbaI-Restriktionsschnittstelle.

Abb. 4.12

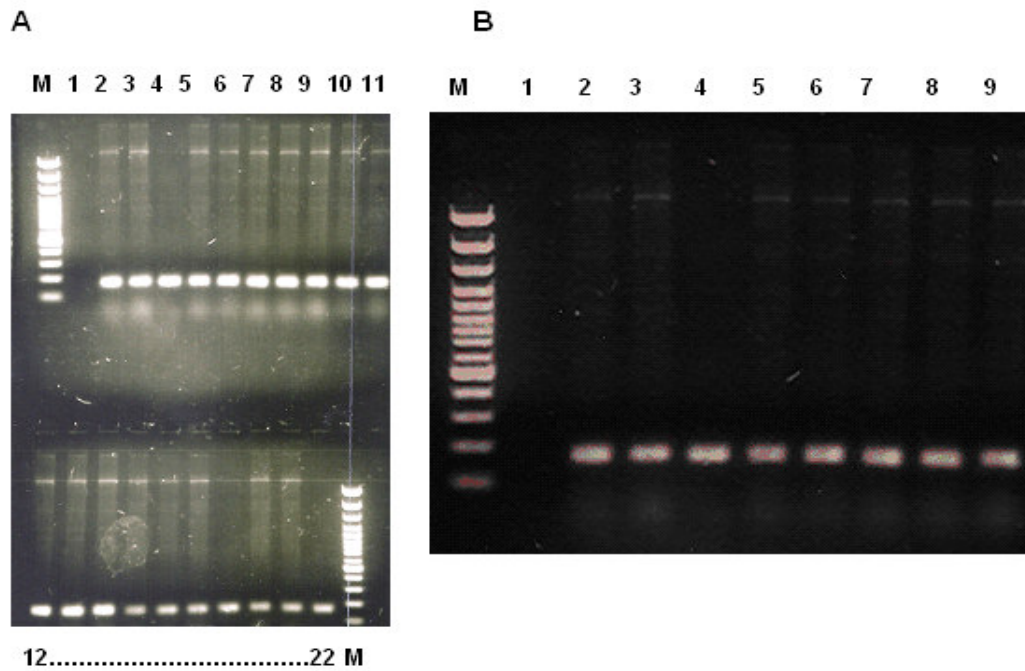


Abb. 4.12 Amplifizierung des p23-Promotors mit Hilfe der Primer Sall-p23 und p23-XbaI
(A) Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2 bis 22: p23-Promotor-Fragment bei etwa 165bp.
(B) Klon-PCR zum Nachweis des modifizierten p23-Promotors-Fragments im pMO-2 Plasmid; als Primer wurden Sall-p23 und p23-XbaI verwendet; Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2-9: p23-Promotor bei ca. 165bp; Auftrennung im 2% Agarosegel; Größenmarker GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (von oben nach unten): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

Abb. 4.13

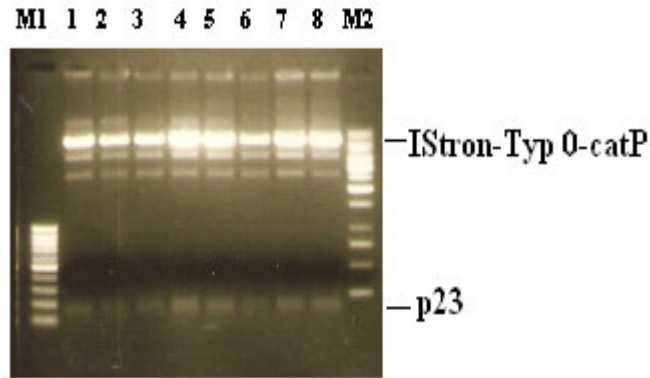


Abb. 4.13 Nachweis des einklonierten Sall-p23-XbaI Promotors

Die Spuren 1-8 zeigen die Sall-XbaI doppel-verdautes Konstrukte; bei ca. 165bp erkennt man den p23-Promotor, oberhalb erkennt man die Varianten von Plasmid pMO-2(+) bzw. pMO-2(-) (IStron(+)-P2catP+, IStron(+)-P2catP-, IStron(-)-P2catP+, IStron(-)-catP-, IStron(+)-P9.1catP+, IStron(+)-P9.1catP-, IStron(-)-P9.1catP+, IStron(-)-P9.1catP-); der hier gezeigte Verdau war nicht vollständig, so dass unverdautes Plasmid verblieb; die Auftrennung erfolgte über einem 2% Agarosegel; als Größenmarker dienten M1: ein GeneRuler 100bp-DNA-Leiter (von oben nach unten): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp; M2 ein GeneRuler 1kb-DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25kb.

4.2.6 Funktionelle Analyse des IStron-catP Konstrukts

Als Nächstes galt es die Frage zu klären, inwieweit das in P2- und P9.1-Loop eingeführte 790nt große catP-Gen das Spleißverhalten des IStrons beeinflusst. Die Untersuchung der Spleißaktivität von pMO-3 wurde erneut durch den RT-PCR Zugang ausgeführt. Pseudosyn1 und Pseudosyn2 wurden als Primer eingesetzt. Die Abbildung 4.14 zeigt die Ergebnisse. Für das konstruierte IStron mit catP-Gen in P2- und P9.1-Loop konnten über die RT-PCR die gespleißten Produkte generiert werden. Nach Integration des catP-Gens entstanden zusätzliche kryptische Spleißstellen, so dass neben den regulären Spleißprodukten im Falle des P2catP zusätzliche Spleißprodukte bei ca. 410bp und im Falle des P9.1catP bei ca. 220bp auftauchten.

Anschließend, nach TA-Cloning der RT-PCR Produkte (Abb. 4.15) in pCR2.1 durchgeführte Sequenzierungen, haben bewiesen, dass es sich größtenteils um reguläre Spleißprodukte handelte, so dass man davon ausgehen konnte, dass das eingeführte catP-Gen keinen Einfluss auf die Spleißaktivität des IStrons hat. Auch hier wurde das Konstrukt auf seine Reaktionskinetik hin untersucht.

Abb. 4.14

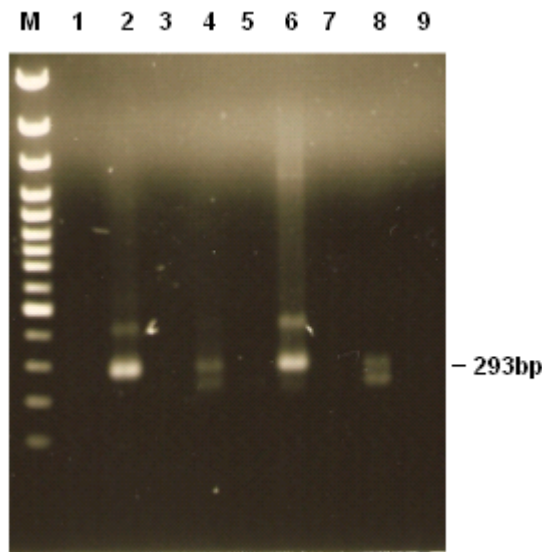


Abb. 4.14 Spleißreaktion des IStrons mit catP-Gen integriert in P2- oder P9.1-Loop
Die Spleißing-Reaktion wurde jeweils mit Sense- oder Antisense-Orientierung des CatP-Gens ausgeführt: als Primer dienten Pseudosyn1 und Pseudosyn2, als Template wurde cDNA eingesetzt: Spuren 2, 4, 6, 8: 2: P9.1catP+; 4: P2catP+; 6: P9.1catP-; 8: P2catP-; zugehörige Kontrollen: Spuren 1, 3, 5, 7; als Negativkontrolle Spur 9: Wasser; bei der cDNA Kontrolle wurde das Enzym Reverse Transkriptase dem Reaktionsansatz nicht zugesetzt; fehlende Amplifikate in den Spur 1, 3, 5 und 7 beweisen, dass die Banden in Spur 2, 4, 6 und 8 auf gespleißte RNA und nicht auf mögliche DNA-Kontaminationen zurückzuführen sind; bei allen Konstrukten kann man die Soll-Spleißprodukte von ca. 293bp erkennen; bei P9.1catP (Spur 2 und 6) erkennt man zusätzliche Spleißprodukte bei ca. 410bp, bei P2catP (Spur 4 und 8) zusätzliche Banden bei ca. 220bp; Auftrennung im 2% Agarosegel; Größenmarker GeneRuler 100bp Ladder Plus; Bandengröße der DNA-Leiter von oben nach unten: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

Abb. 4.15

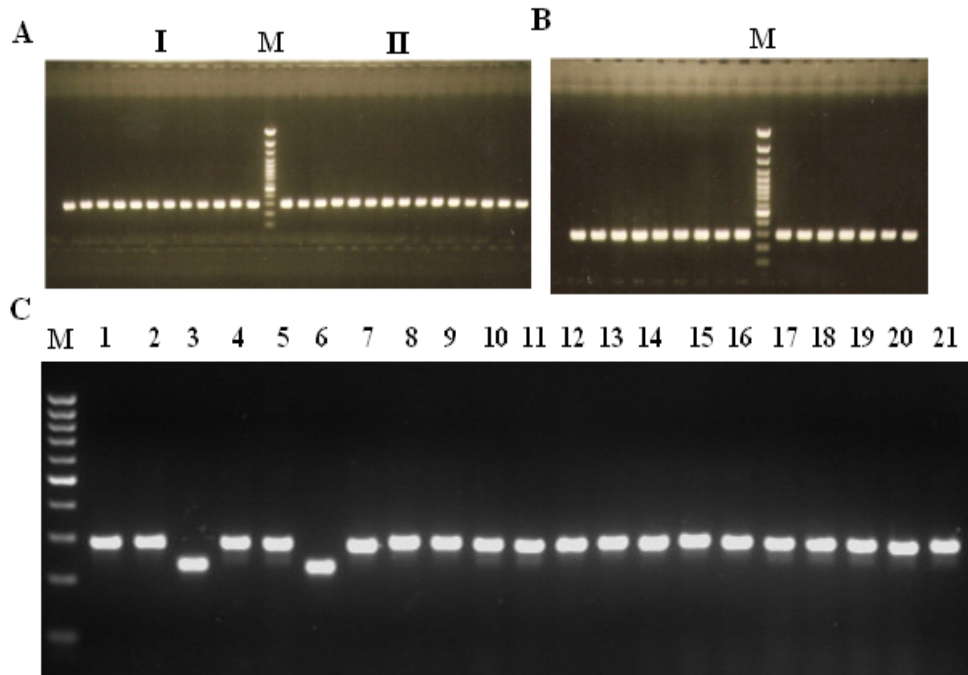


Abb. 4.15 TA-Cloning und Sequenzieren der Spleißprodukte zur Verifizierung der Spleißaktivität
Die cDNA-Fragmente wurden via TA-Cloning in den pCR2.1-Vektor einkloniert; als Primer wurden Pseudosyn1 und Pseudosyn2 verwendet.

(A) I: P9.1catP- / II P9.1catP+

(B) P2catP-

(C): P2catP+

Außer in den Banden 3 und 6 findet man Banden bei ca.293bp, die dem Sollspleißprodukt entsprechen; die Banden von ca. 220bp in den Spur 3 und 6 entsprechen kryptischen Spleißprodukten, die nach Integration des catP-Gens entstehen; entsprechende Produkte waren bereits bei dem Spleißen des nativen IStrons beobachtet worden (Hasselmayer et al.); die Auftrennung erfolgte auf einem 3% Agarosegel; als Größenmarker diente die GeneRuler 100bp DNA-Leiter (von oben nach unten): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp.

4.2.7 Deletionen des TlpA und TlpB aus den Konstrukten p23-IStron-P2catP(+/-) und p23-IStron-P9.1catP(+/-)

Da die Mobilität höchstwahrscheinlich von den Transposasen TlpA und TlpB vermittelt wird, waren im Vergleich zu den vollständigen IStrons geeignete Negativkontrollen erforderlich. Dazu wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCRs Deletionen in dem IS-Element Anteil des IStrons Typ 0 induziert, um aus den Konstrukten p23-IStron(+)-P2catP(+), p23-IStron(+)-P2catP(-), p23-IStron(+)-P9.1catP(+) und p23-IStron(+)-P9.1catP(-) analoge „Typ-III-Varianten“ zu erzeugen. Der prinzipielle Vorgang ist in Abbildung 4.16 zusammengefasst.

In einer ersten PCR wurden zwei Teilfragmente des IStron-catP-p23-Konstrukts hergestellt, in denen der IS-Element-Anteil deletiert war. Mit den Primern P1=Sallp23 und P2=Mobilität-MP1-3' wurde das Teilfragment MP1(1785bp) amplifiziert; und mit

den Primern P3=Mobilität-MP2-5' und P4=Mobilität-MP2-BamHI wurde das Teilfragment MP2(355bp) amplifiziert (Abb. 4.17). Die Amplifikate MP1 und MP2 wurden aus Agarosegel extrahiert, gereinigt (siehe QIAEX® II) und danach für eine zweite PCR eingesetzt. Die zweite PCR wurde mit Hilfe des PCR-Systems TripleMaster® von Eppendorf durchgeführt. Nach dem ersten Zyklus fungierten die beiden Fragmente MP1 und MP2 als sogenannte Megaprimer zur Amplifikation des Typ-III-Konstrukts. Im zweiten Zyklus wurden die endständigen Primer zur Vervielfältigung beigefügt (Abb. 4.18). Die erzeugten Fragmente wurden nach TA-Cloning in den pCR2.1-TOPO-Vektor durch Sequenzierung verifiziert.

Abb. 4.16

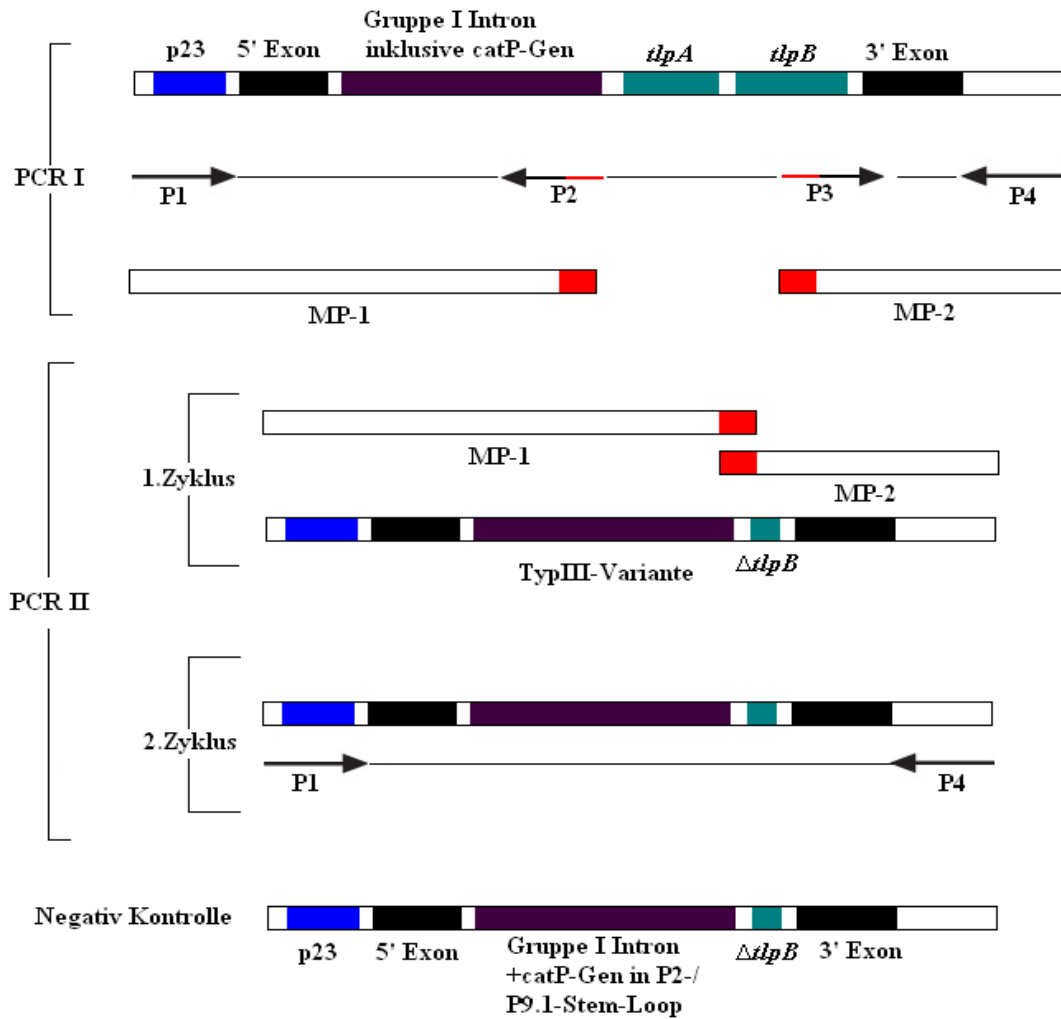


Abb. 4.16 Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Schritte zur Deletion des *TlpA*- und *TlpB*-Anteils.

In einer ersten PCR wurden mit Hilfe der Primer P1-P4 (P1=Sallp23, P2=Mobilität-MP1-3', P3=Mobilität-MP2-5', P4=Mobilität-MP2-BamHI) Teilfragmente MP1 und MP2 amplifiziert; als Template dienten dabei: die IStron(+) Konstrukte p23-IStron(+)P2catP+, p23-IStron(+)P2catP-, p23-IStron(+)P9.1catP+, p23-IStron(+)P9.1catP-; aus diesen Teilfragmenten wurden in einer zweiten PCR mit den Primern P1=Sallp23 und P4=Mobilität-MP2-BamHI P1 die einzelnen Typ III Varianten (Negativkontrollen) amplifizierten. Die haben eine Größe von 2140 bp.

Abb. 4.17

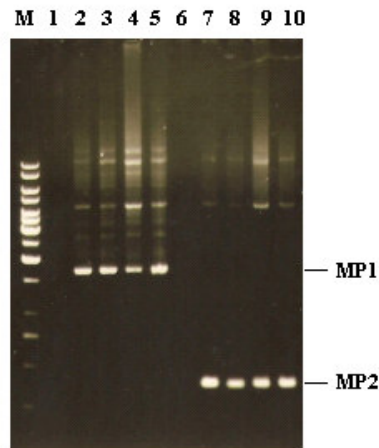


Abb. 4.17 Teilfragmente MP1 und MP2

Kontrolle der durch rekombinante PCR hergestellten Teilfragmente MP1 und MP2. PCR-Amplifikation der Teilfragmente MP1 und MP2 mit Hilfe der Primer P1=Sallp23, P2=Mobilität-MP1-3', P3=Mobilität-MP2-5', P4=Mobilität-MP2-BamHI; Spur 1 und Spur 6 sind für die einzelnen PCRs die Negativkontrolle, Spuren 2 bis 5 zeigen das Fragment MP1 bei etwa 1785bp, Spuren 7-10 zeigen die MP2 Fragmente bei etwa 355bp; als Template in den Spuren 2-10 dienten: 2/7: p23-IStrom(+)-P2catP+; 3/8: p23-IStrom(+)-P2catP-; 4/9: p23-IStrom(+)-P9.1catP+; 5/10: p23-IStrom(+)-P9.1catP-; die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel; als Größenmarker diente die GenRuler 1kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0,75 kb.

Abb. 4.18

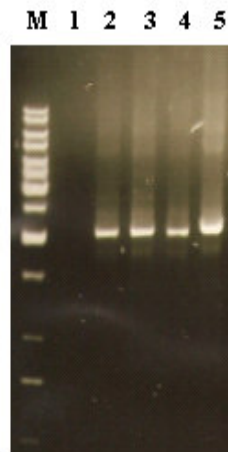


Abb. 4.18 Typ III - Varianten der p23-IStrom-P2catP(+/-) und p23-IStrom-P9.1catP(+/-) Konstrukte Darstellung des über die zweite PCR mit den Primern P1=Sallp23 und P4=Mobilität-MP2-BamHI amplifizierten Typ III: Negativkontrollen die eine Größe von 2140 bp haben. Spur 1 ist die Negativkontrolle bezüglich der PCR; die Spuren 2 -5 zeigen die Typ-III-Negativkontrollen der einzelnen Konstrukte. In den Spuren 2-5: 2: p23-IStrom(+)-P2catP+; 3: p23-IStrom(+)-P2catP-; 4: p23-IStrom(+)-P9.1catP+; 5: p23-IStrom(+)-P9.1catP(-). Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel; als Größenmarker diente die GenRuler 1kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0,75 kb.

Nun waren die benötigten Konstrukte im Vektor pTZ19R erzeugt; das als Reporter gen ausgewählte *catP*-Gen wurde in Sense- und Antisense-Orientierung in den P2- und P9.1-Stem-Loop kloniert; die Transkription in gram(+)-Bakterien, in der vorliegenden Arbeit *L. innocua*, sollte durch den p23-Promotor gesteuert werden. Die IStron-Konstrukte wurden jeweils in Sense- und Antisense(-)-IStron-Varianten generiert die IStron(+) und IStron(-)-Variante. Zudem wurden Negativkontrollen mit einer Deletion im IS-Element Anteil (entsprechend dem Typ III-IStron) erzeugt. Die Abbildung 4.19 gibt eine Übersicht über die erzeugten Konstrukte. Die für die Umklonierung in den Vektor pAUL-A entscheidenden, singulären Schnittstellen Sall und BamHI sind in dem Konstrukt eingezeichnet.

In *C. difficile* sind mehrere Kopien des IStrons vorhanden, die über ein komplett erhaltenes *tlpB*-Gen verfügen. Dies gilt insbesondere für die Typen 0, I und II. Wegen solcher Mehrfachkopien entsteht die Problematik, dass Transpositionen aus Cis- oder Trans-Stellung induziert werden könnten. In *C. difficile* könnten Transposasen aus benachbarter Cis- oder entfernter Trans-Stellung anderer IStrons bereitgestellt werden. Frühere Studien zu anderen transposablen Elementen haben gezeigt, dass Transpositionen effizienter werden, wenn die Transposase durch das Element selbst gebildet wird; oder wenn das Transposase-Gen in der Nähe oder gar auf dem gleichen DNA-Molekül vorliegt. Die Bevorzugung einer solchen Cis-Aktivität reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass Transposase-Expression, ausgehend von einem beliebigen Element, die Aktivierung der Transposition einer Kopie an anderer Stelle im Genom induziert. Beim hier geplanten Mobilitätsassay in *L. innocua* entfiel diese Schwierigkeit. Es ist egal, ob die Transposition aus Cis- oder Trans-Stellung abläuft, weil es in *L. innocua* nur die eine Art des IStrons gibt und keine weiteren IStron-Varianten geben wird. Damit sind die Typ-III-Varianten der generierten Konstrukte geeignete Negativ-Kontrollen für die Transposase-Aktivität.

Abb. 4.19

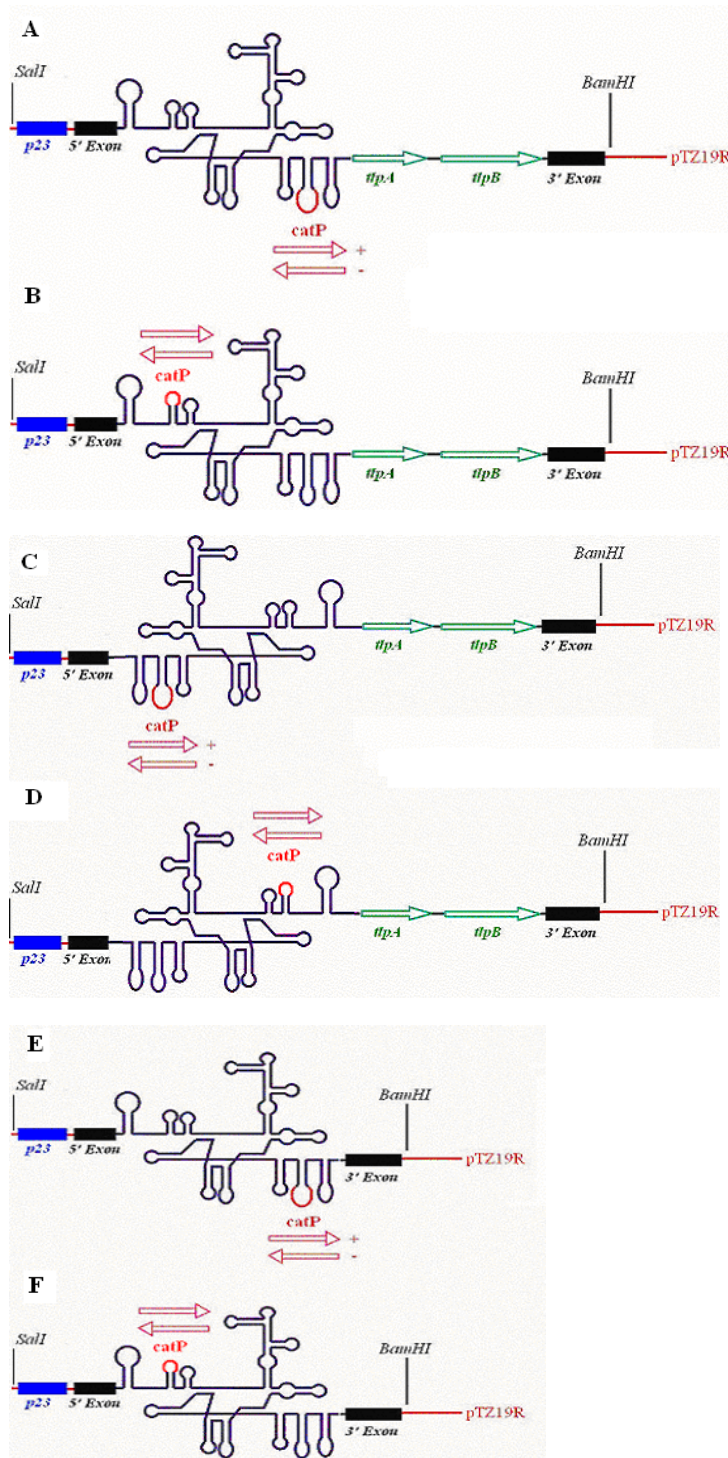
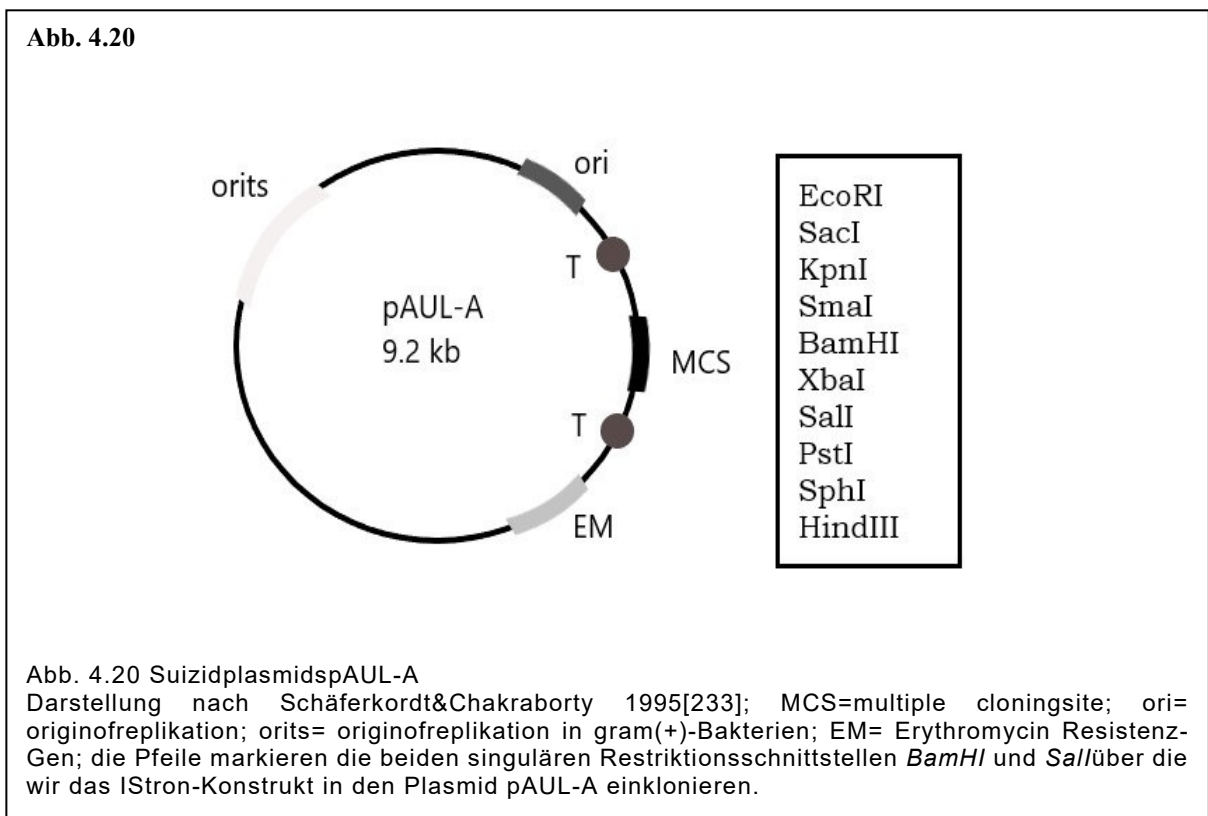


Abb. 4.19 Schematische Darstellung der generierten Konstrukte:

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Konstrukte in linearisierter Form dargestellt: die für die Umklonierung in den Vektor pAUL-A entscheidenden singulären Schnittstellen SalI und BamHI sind in dem Konstrukt eingezeichnet; als Grundgerüst für die Generierung des Konstrukts zur Analyse der Mobilität wurde der Vektor pTZ19R (rot) verwendet; das als Reporter gen ausgewählte catP-Gen wurde in Sense- und Antisense-Orientierung in den P2- und P9.1-Stem-Loop kloniert; die Transkription in gram(+)-Bakterien, in der vorliegenden Arbeit *L. innocua*, sollte durch den p23-Promotor gesteuert werden (blau dargestellt). In (A) und (B) sind jeweils die IStron(+)-Konstrukte dargestellt, in (C) und (D) die Antisense(-)-IStron-Varianten; (E) und (F) zeigen die Negativkontrollen mit einer Deletion im IS-Element Anteil (entsprechend dem Typ-III-IStron, siehe Text), die den Konstrukten aus A und B entsprechen.

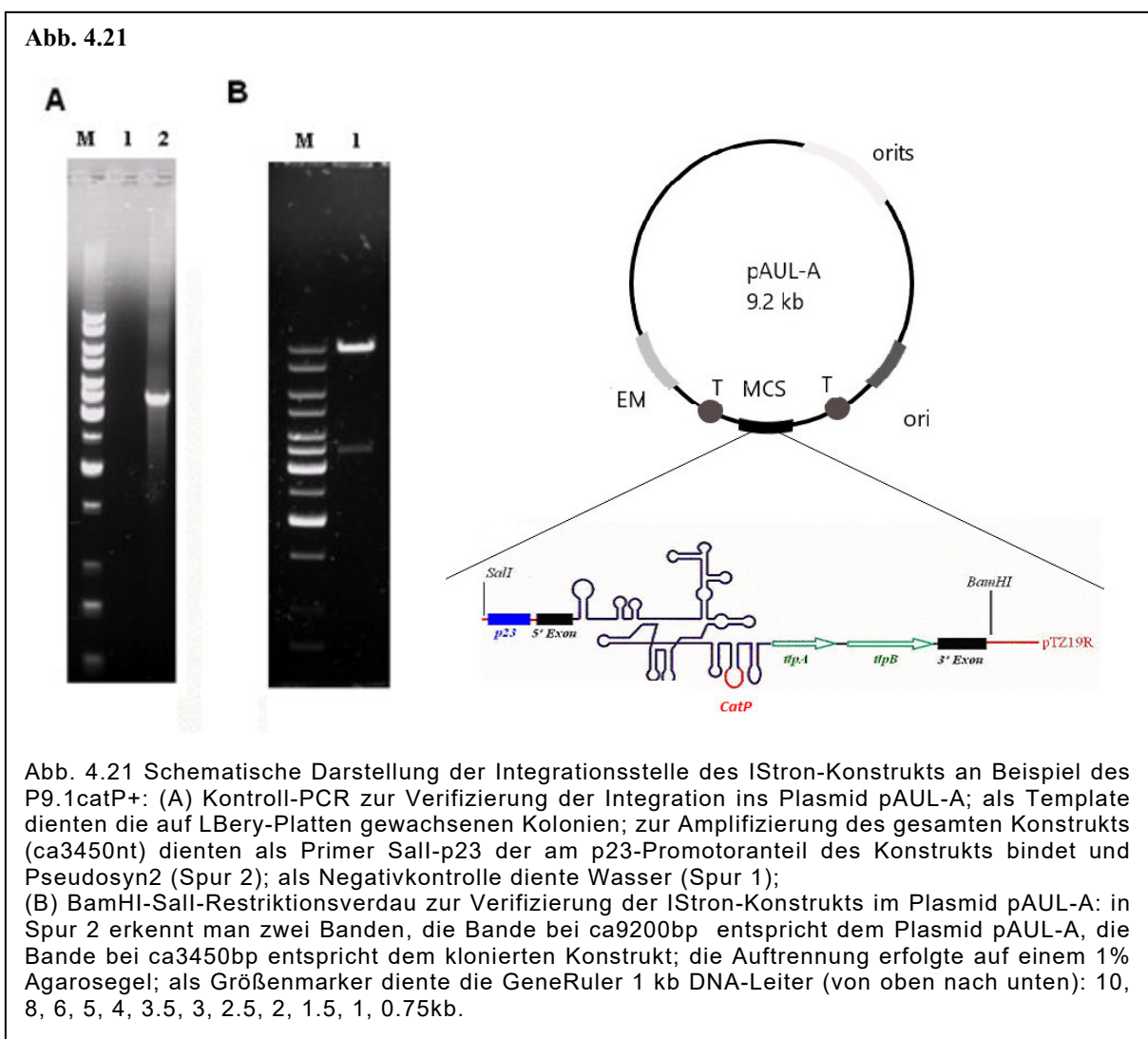
4.3 Untersuchung im Modelorganismus *L. innocua*

Die Untersuchungen zur Mobilität des IStrons können selbst nicht in *C. difficile* durchgeführt werden, da in allen bisher untersuchten *C.-difficile*-Stämmen zumindest eine Kopie des IStrons enthalten ist [185]. Als gut geeignete Alternative zu *C. difficile* eignete sich der apathogene Keim *Listeria innocua*, der ein ähnliches Codon-Usage wie *C. difficile* besitzt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass in *L. innocua* die beiden IStron kodierten, potentiellen Transposasen TlpA und TlpB exprimiert werden sollten. Ein weiterer Grund für die Wahl von *L. innocua* als Modell-Organismus lag darin, dass für diesen Keim mit dem Suizidplasmid pAUL-A ein Derivat der pE194 Familie von Suizidplasmiden mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori) verfügbar war [233]. Dieser Vektor enthält sowohl Regulationssequenzen für gram(+)-Bakterien als auch für *E. coli* [233] (Abb.4.20). Die Klonierungsschritte können bei diesem Vektor in *E. coli* durchgeführt werden, was die Klonierungen wesentlich vereinfachen sollte.



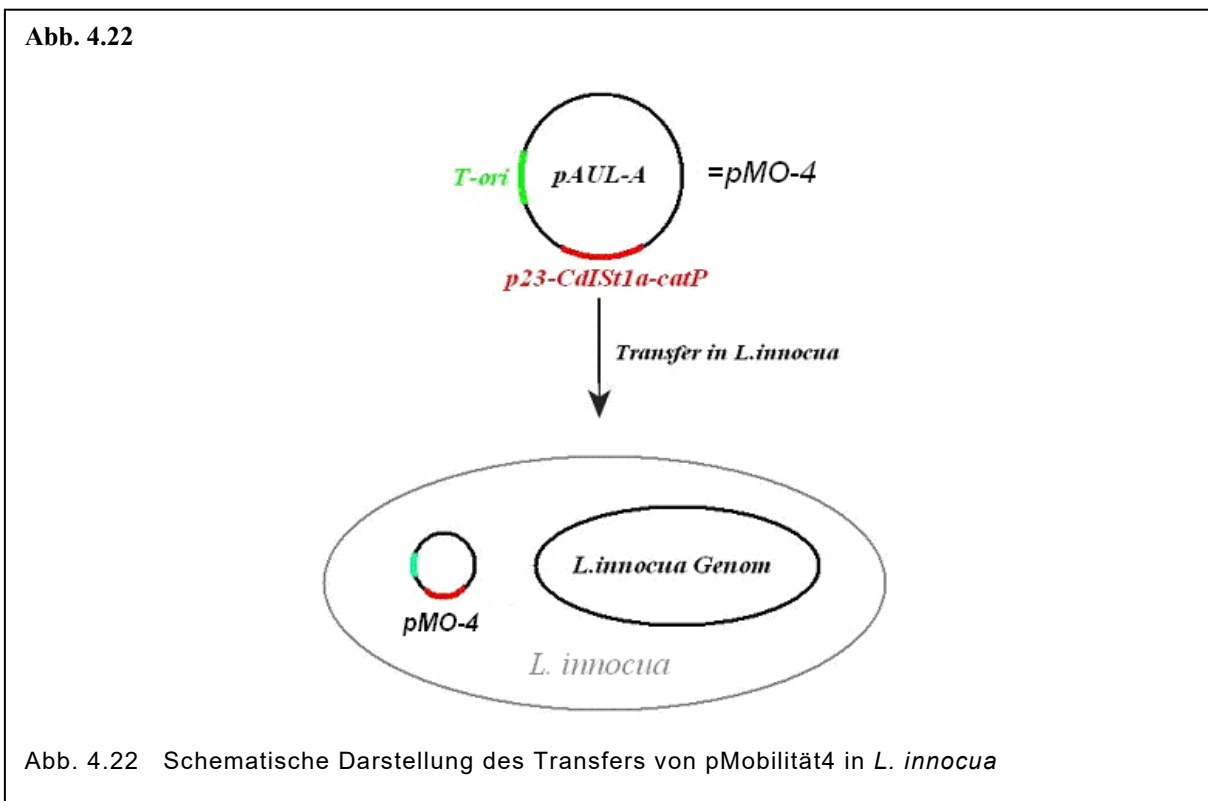
4.3.1 Umklonieren der catP-Konstrukte in das Suizidplasmid pAUL-A

Das IStron-Konstrukt wurden aus dem Plasmid pMO-3 über die beiden singulären Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall mobilisiert und in das ebenfalls BamHI-Sall verdaute Plasmid pAUL-A ligiert. Das so entstandene Plasmid (pAUL-A + IStron-Konstrukt) wurde als pMO-4 bezeichnet. pMO-4 wurde danach über Elektroporation in *E. coli* DH5 α transformiert und auf LBery-Platten selektioniert. Da *E. coli* DH5 α , anders als *E. coli* Top10, über keine Erythromycin Resistenz verfügt, konnten pAUL-A-Konstrukte über Erythromycin-Resistenz des Plasmids selektioniert werden. Die gewachsenen Kolonien wurden über PCR-Amplifikationen analysiert. Nach Plasmid-Mini-Präparation aus dem *E. coli* DH5 α wurde die Integration der jeweiligen IStron-Konstrukte verifiziert (Abb.4.21)



4.3.2 Transformation der pMO-4-Konstrukte in *L. innocua*

In der Literatur gibt es keine Informationen darüber, ob die *catP*-Gens für *L. innocua* geeignet ist. Daher musste zunächst die Funktionalität des *catP*-Gens in-vivo in *L. innocua* nachgewiesen werden. Das gereinigte und durch Sequenzierung überprüfte P9.1*catP*+ Konstrukt, das sich im Suizidvektor pAUL-A befand, wurde über Protoblasten-Transformation in *L. innocua* transformiert (Abb.4.22).



4.3.3 Kontrolle der pMO-4-Konstrukte nach Transformation in *L. innocua*

Um die erfolgreiche Transformation zu kontrollieren, wurde aus *L. innocua* Plasmid-DNA isoliert und mittels Kontroll-PCR und Transformation in *E. coli* DH5 α analysiert. Die Konstrukte wurden anschließend durch PCR-Amplifikation unter Verwendung des Primerpaars Sall-p23/Pseudosyn2 überprüft. Amplifiziert wurden dadurch IStron+*catP*-Gen+p23-Promotor-Fragmente, es sollten 3450bp große Fragmente entstehen. Zur weiteren Kontrolle sollte ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit BamHI und Sall durchgeführt werden. Dazu wurde die aus *L. innocua* isolierte DNA durch Elektroporation in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Erythromycin-Platten selektioniert. Anschließend wurde von Einzelkolonien Übernachtskulturen bei

Anwesenheit von Erythromycin angezogen und daraus zur weiteren Analyse DNA mittels Plasmid-Mini-Präp gewonnen. Nach BamHI-Sall-Doppelverdau sollten zwei Fragmente entstehen, ein 9200bp Fragment, das dem Plasmid pAUL-A entspricht, und ein 3450bp Fragment, das dem Konstrukt entspricht. In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse dargestellt.

Abb. 4.23

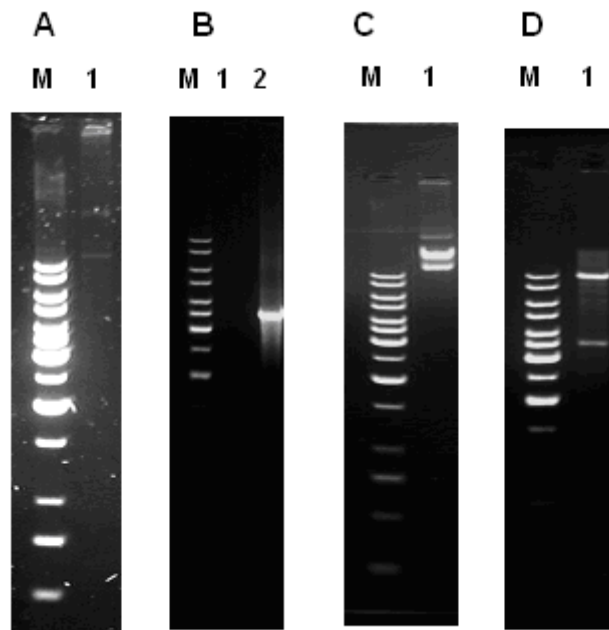


Abb. 4.23 Transformation der pMO-4 Konstrukte in *L. innocua*
 Kontrolle der pMO-4 Konstrukte nach DNA-Isolation aus *L. innocua*:(A) In Spur 1 ist schwach die aus *L. innocua* isolierte Plasmid-DNA zu erkennen. (B) Kontroll-PCR zur Verifizierung des Konstrukts. Als Template diente die aus *L. innocua* isolierte Plasmid-DNA. Zur Amplifizierung des Konstrukts (ca3450nt) dienten als Primer Sall-p23, der am p23-Promotoranteil des Konstrukts bindet, und Pseudosyn2 (Spur2). Als Negativkontrolle diente Wasser (Spur 1); zur weiteren Kontrolle wurde zusätzlich ein Restriktionsverlauf der Plasmid-DNA mit BamHI und Sall durchgeführt. Dazu wurde die aus *L.innocua* isolierte DNA zunächst mittels Elektroporation in *E.coli* DH5 α transformiert und auf Erythromycin-Platten selektioniert; anschließend wurden Einzelkolonien über Nacht unter Anwesenheit von Erythromycin angezogen und mittels Plasmid-Mini-Präp DNA zur weiteren Analyse gewonnen; (C) Darstellung der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA; da diese nicht linearisiert wurde, erscheinen mehrere Banden an unterschiedlicher Höhe (typische coil- und supercoil-Strukturen; (D) nach BamHI-Sall-Doppelverdau entstehen zwei Fragmente, das 9200bp-Fragment entspricht pAUL-A, das 3450bp-Fragment entspricht dem Konstrukt (Spur 1); die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel; als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75kb.

4.3.4 Funktionelle in-vivo-Analyse des P9.1catP+ Konstrukts

Die erste und essentielle Frage, die es zu beantworten galt, war, ob die als Reporter gen verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase (das catP-Gen) in *L. innocua* transkribiert wird. Das hing insbesondere davon ab, ob der p23-Promotor in *L. innocua* funktionell exprimiert wird. Für *L. innocua* sind diesbezüglich keine Daten veröffentlicht.

Die als Reporter gen verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase ermöglichte über eine Chloramphenicol-Selektion die Überprüfung der Funktion der Konstrukte. Chloramphenicol diffundiert durch die bakterielle Plasmamembran und bindet an die ribosomale 50S-Untereinheit. Es kommt zur Blockade der Aminoacyl-tRNA Akzeptorstelle und damit zur Blockade der Proteinbiosynthese. Das Antibiotikum kann sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid wirken. Die Resistenz von Bakterien gegenüber Chloramphenicol beruht auf einer Inaktivierung des Antibiotikums durch Acetylierung. Die inaktivierend wirkende Chloramphenicolacetyltransferase, ist ein Tetramer aus identischen Untereinheiten der molaren Masse von 23-25 kDa. Der Reaktionsmechanismus der Inaktivierung, dargestellt in Abbildung 4.24, beinhaltet insbesondere eine Acetylierung des Chloramphenicols in Position C3. Das dabei gebildete 3-Acetoxy-Chloramphenicol ist bereits wirkungslos. Durch eine intramolekulare Umlagerung kann die Acetylgruppe auf die C1-Position übertragen werden, so dass in einer weiteren enzymatischen Reaktion die C3-Position erneut acetyliert werden kann.

Abb. 4.24

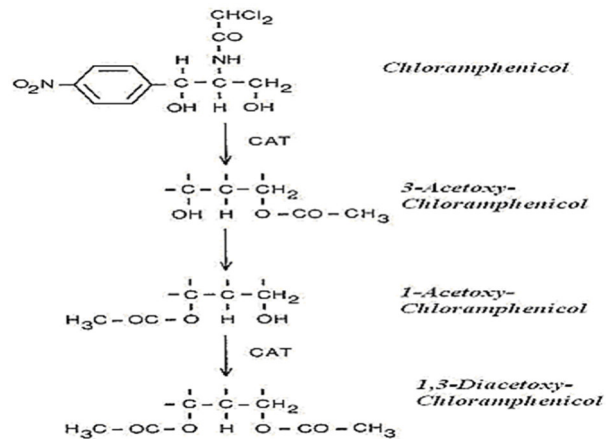


Abb. 4.24 Inaktivierung des Chloramphenicols durch die Chloramphenicolacetyltransferase: Nach Acetylierung in Position C3 kommt es zur intramolekularen Umlagerung der Acetylgruppe auf die C1-Position, wodurch die C3-Position nochmals enzymatisch acetyliert werden kann (Quelle: Biologie Bakterieller Plasmide, S. 168, W. Schumann).

4.3.5 Wachstumskontrolle in Flüssigmedium

Um die Funktion der Resistenz in *L. innocua* zu beurteilen, wurde das Bakterienwachstum in Brain-Heart-Infusion mit aufsteigender Chloramphenicol-Konzentration getestet. Das Wachstum wurde nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden durch Trübungsmessung überprüft. Dazu wurde im Spektralphotometer die optische Dichte der Suspensionen bei einer Wellenlänge von 600nm (OD600) gemessen. Als Leerwert wurde das entsprechende sterile Medium mit identischem Gehalt an Chloramphenicol eingesetzt. Der Wildtyp zeigt sich als deutlich sensibel gegenüber Chloramphenicol. Das Wachstum in Gegenwart von Chloramphenicol war schon bei niedrigen Antibiotika-Konzentrationen deutlich gehemmt.

Zur Testung der p-MO-4 Konstrukte in Listerien wurden analoge Chloramphenicol-Konzentrationsreihen eingesetzt und das Wachstum der pMO-4-Derivate mit dem der plasmidfreien Wildtyp-Listerienstämme verglichen. Ferner wurden Bakterien sowohl bei der optimalen Replikationstemperatur von 30°C als auch der nicht-replikativen Temperatur von 42°C angezogen, da das Plasmid pAUL-A über einen temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori) verfügt. Bei 30°C (unter Plasmid-replizierenden Bedingungen) wuchsen nur die Listerien mit pMO-4, nicht aber die Wildtyp-Bakterien (Abb. 4.25; zeigt nur das pMO-4 Wachstum, denn *L. innocua* Wildtyp wächst schon bei geringen Chloramp-Konzentrationen nicht mehr). Bei 42°C

unterscheiden sich das Wachstum der pMO-4 Transformaten nicht von dem des Wildtyps (Abb. 4.26).

Abb. 4.25

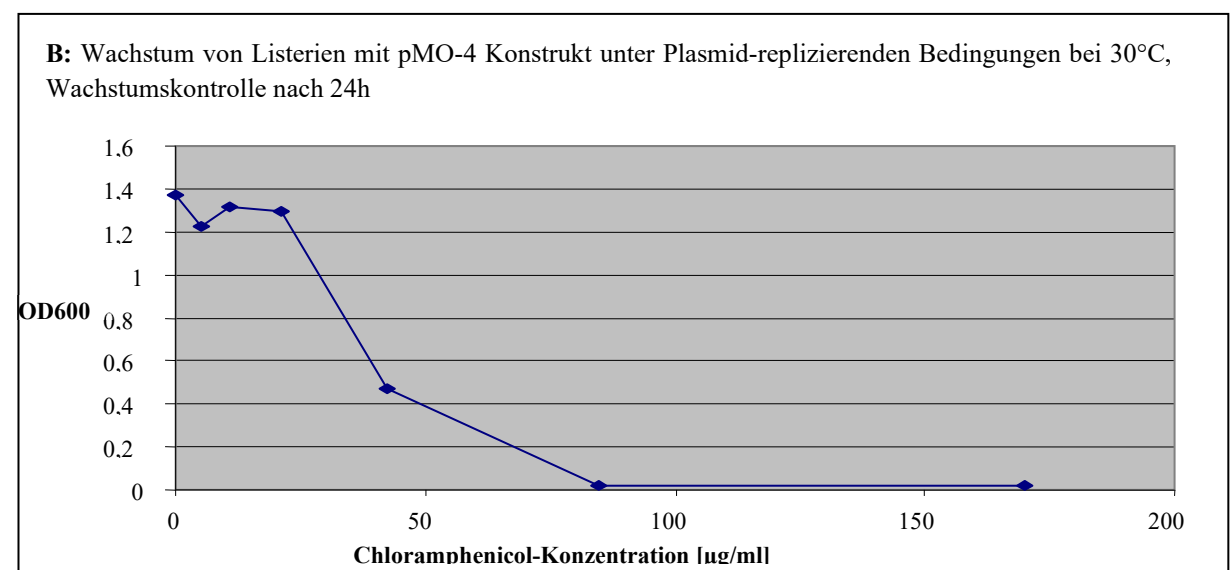
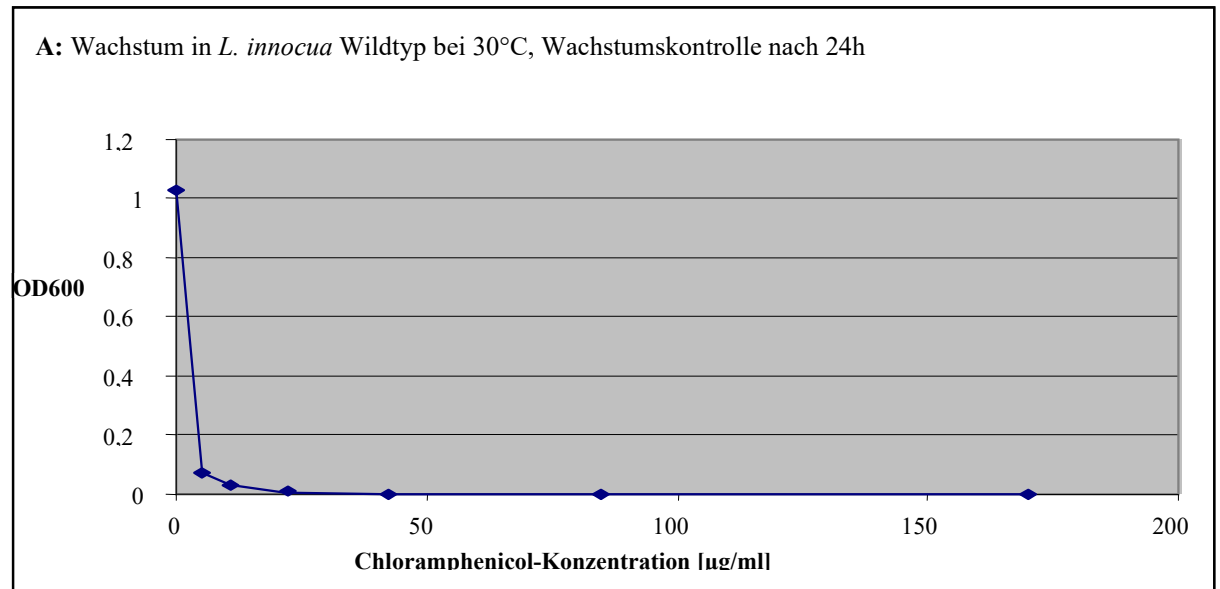


Abb. 4.25

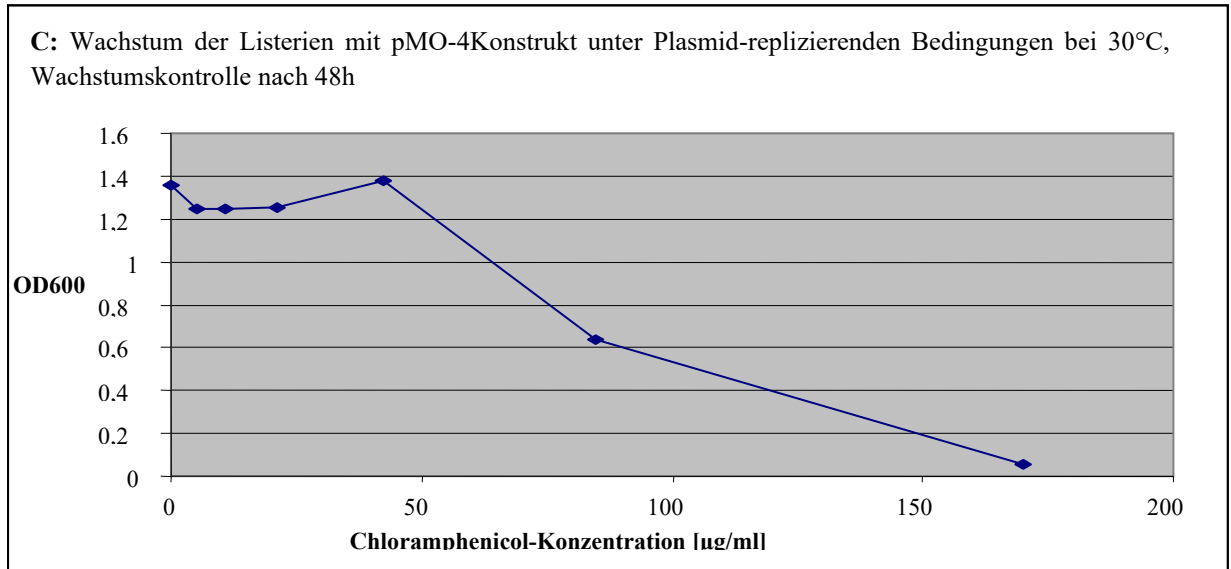


Abb. 4.25 Wachstum unter Plasmid-replizierenden Bedingungen:

A) Wachstum von *L. innocua* Wildtyp bei 30°C, Wachstumskontrolle nach 24h. Wachstum der Listerien mit pMO-4Konstrukt unter Plasmid-replizierenden Bedingungen Wachstum bei 30°C nach (B) 24 Stunden und nach (C) 48 Stunden.

Abb. 4.26

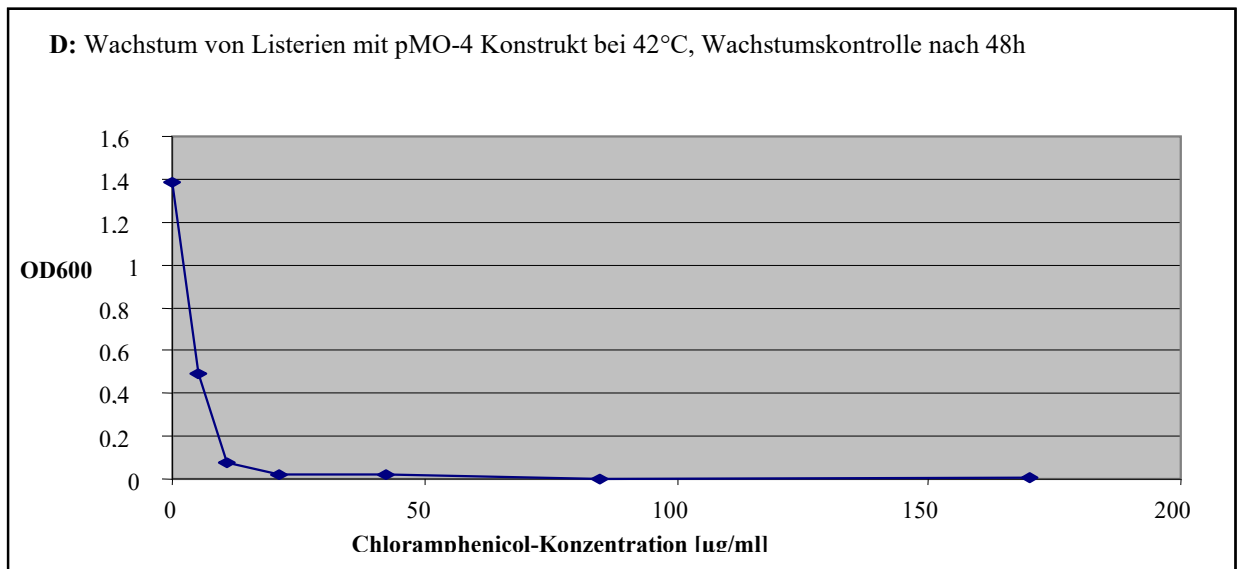
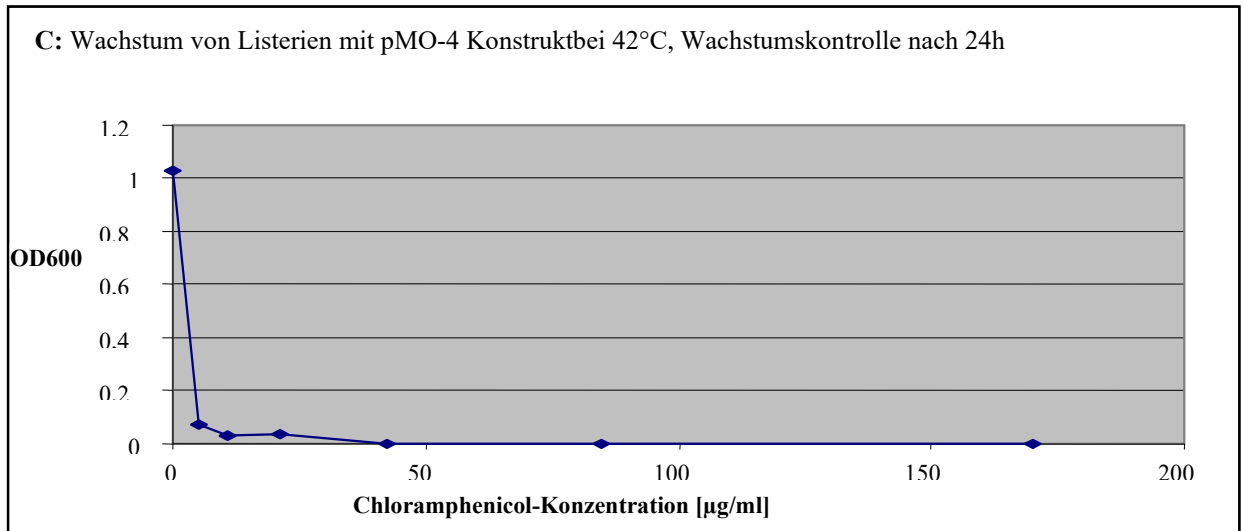


Abb.4.26 Wachstum der Listerien mit dem Konstrukt bei 42°C:

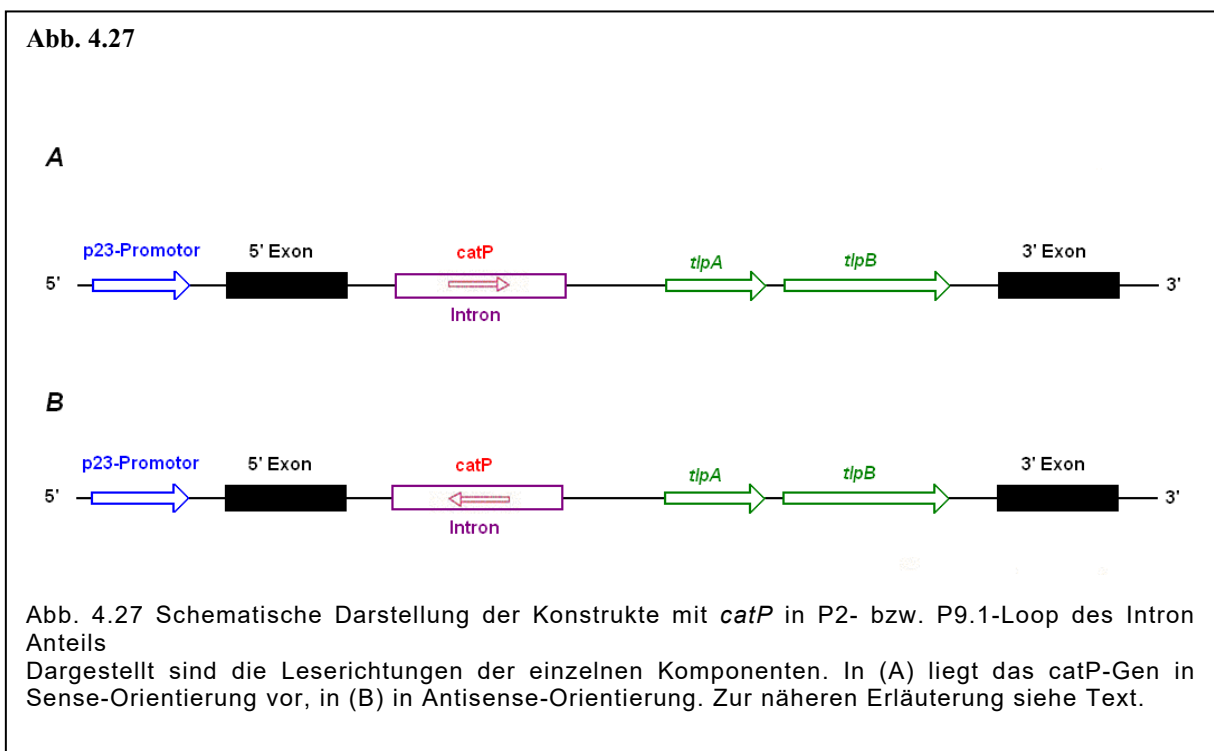
Wachstum bei nicht replizierenden Bedingungen (42°C): (C) nach 24 Stunden (D) nach 48 Stunden.

4.3.6 Wachstumskontrolle auf Selektivplatten

Für Listerien, die unter Selektionsdruck wachsen sollen, wird in der Literatur eine Chloramphenicol Konzentration von 5-10 µg/ml angegeben. Daher wurde auf Brain-Heart-Infusion-Chloramphenicolplatten bei einer Konzentration von 5 und 10 µg/ml

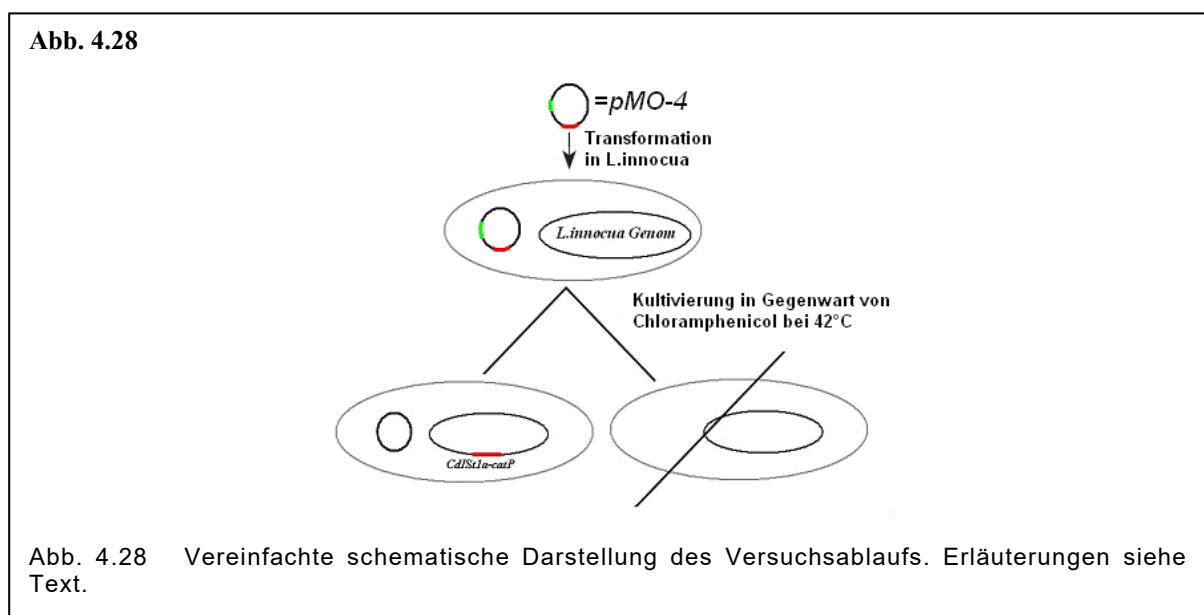
getestet. Inkubiert wurde bei 30°C und 37°C also, im Fall der Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, unter Plasmid-replizierenden Bedingungen. Beim Wildtyp konnte kein sichtbares Wachstum beobachtet werden, weder bei 5 noch bei 10 µg/ml. Bei den Listerien, die das Plasmid pMO-4 trugen, war sowohl bei einer Konzentration von 5 µg/ml als auch bei einer Konzentration von 10µg/ml ein deutliches Wachstum zu beobachten. Somit war der Beweis erbracht, dass das *catP*-Gen in *L. innocua* funktionell transkribiert und exprimiert wird.

Der Nachweis des Wachstums von *L. innocua* bei Gegenwart von Chloramphenicol zeigte, dass *catP* als Reporter gen für Experimente in *L. innocua* gut geeignet ist. Im Fall der Bezeichnung *catP*⁺ liegen der p23-Promotor und das Reporter gen in derselben Orientierung vor, im Fall von *catP*⁻ sind die Leserichtungen entgegengesetzt. Das *catP* besitzt keinen Terminator und auch das Konstrukt enthält kein Stop-Codon, so dass man davon ausgehen konnte, dass bei nachgewiesener Transkription des *catP*-Gens auch *tlpA* und *tlpB* transkribiert wurden. Damit sollten die Transposasen TlpA und TlpB in ausreichender Konzentration gebildet werden (Abb. 4.27). Bei *catP*-Konstellation sollte die Transkription von *tlpA* und *tlpB* nicht initiiert, sondern eher behindert werden. Die *catP*(-)-Konstrukte wurden daher in den nachfolgenden funktionellen Assays als Negativkontrollen eingesetzt.



4.3.7 Plasmid-nicht-replizierenden Bedingungen

Um die Mobilität der IStrons zu untersuchen, wurden die Listerien, die das konstruierte Plasmid pMO-4 tragen, bei 42°C kultiviert, also bei Temperaturen, die eine Replikation des Suizidplasmids nicht erlauben. Gleichzeitig wurde durch Chloramphenicol ein Selektionsdruck ausgeübt. Unter diesen Umständen sollten nur die Bakterienzellen überleben, bei denen das IStron-catP Konstrukt in das Chromosom gesprungen war und von dort aus aktiv werden konnte. (Abb. 4.28).



Für die experimentelle Durchführung wurden die Listerien zunächst bei permissiven 30°C in Brain-Heart-Infusion Flüssigmedium bei Chloramphenicol-Konzentrationen von 10,0; 42,5; 85,0 bzw. 170µg/ml über 24 Stunden angezogen. Bei 10 und 42.5µg/ml war ein sichtbares Wachstum (Trübung) zu beobachten. Bei Chloramphenicol-Konzentrationen, bei denen gerade noch ein Wachstum zu beobachten war, wurden aus der in der Wachstumsphase befindlichen Vorkultur jeweils 1/20 = 250µl der Kultur nochmals in BHI-Flüssigmedium mit derselben Chloramphenicol Konzentration überimpft und bei 30°C über 24 Stunden inkubiert. Aus der in der Wachstumsphase befindlichen Vorkultur wurden jeweils 5, 10 und 50µl auf Brain-Heart-Infusion-Platten mit der Chloramphenicol-Konzentration von 2,5 und 5µg/ml aufgebracht und anschließend bei 42°C (reprimierend) und zum Vergleich analog bei 30°C (permissiv) inkubiert. Nach den Vorergebnissen war bei 30°C unter Einsatz des pMO-4 Plasmids ein deutliches Wachstum zu erwarten.

Die Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse von mehreren Wiederholungen und von 96 Stunden zusammen. Inkubationszeiten länger als 96 Stunden führten zu keinem von diesem Resultat abweichenden Ergebnisse, diese werden daher hier nicht dargestellt. Bei 30°C war in allen Fällen schon früh ein deutliches Wachstum zu beobachten. Bei 42°C war jedoch kein Wachstum zu beobachten.

Tabelle 4.1				
Eingesetztes Vorkultur-Volumen (in µl)	Chloramphenicol-Konzentration [µg/ml]			
	2,5µg/ml		5µg/ml	
	32°C	42°C	32°C	42°C
5	+++	-	+++	-
10	****	-	****	-
50	****	-	****	-

Wachstumskontrolle der *L. innocua* Transformaten nach 96 Stunden.

- : kein sichtbares Wachstum
 + : bis zu 25 Kolonien
 ++ : 200 > Kolonien > 25
 +++ : mehr als 200 Kolonien
 **** : Bakterienrasen

Die Tabelle fasst die Ergebnisse von umfangreichen Untersuchungen des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen zusammen.

Für Listerien, die unter Selektionsdruck wachsen sollen, wird in der Literatur eine Chloramphenicol-Konzentration von 5-10 µg/ml angegeben. Daher wurde auf Brain-Heart-Infusion-Chloramphenicolplatten bei einer Konzentration von 5 und 10 µg/ml getestet. Inkubiert wurde bei 30°C und 37°C, also – im Fall der Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen – unter Plasmid-replizierenden Bedingungen. Beim Wildtyp konnte kein sichtbares Wachstum beobachtet werden, weder bei 5 noch bei 10 µg/ml. Bei den Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, war sowohl bei einer Konzentration von 5 µg/ml als auch bei einer Konzentration von 10µg/ml ein deutliches Wachstum zu

beobachten. Somit war der Beweis erbracht, dass das *catP*-Gen in *L. innocua* funktionell transkribiert und exprimiert wird.

Bei *L. innocua*, die das konstruierte Plasmid pMO-4 tragen, und bei 42°C kultiviert wurden, also bei Temperaturen, die eine Replikation des Suizidplasmids nicht erlauben, konnte kein Wachstum beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Mobilität des *IStrons CdlSt-1*

In offenen Leseraster von *Clostridium difficile* wurde ein neuartiges genetisches Element lokalisiert, das als CdlSt1 bezeichnet wurde und einen chimären Aufbau aus einem Gruppe-I-Intron und dem IS-Element der IS605 Familie aufweist. CdlSt1 konnte in mehreren Kopien in allen untersuchten *C. difficile* Stämmen nachgewiesen werden. In anderen clostridialen Spezies konnte das Gruppe I Intron bislang nicht vorgefunden werden. Der Integrationsort in *C. difficile* war in allen untersuchten Fällen immer ein offenes Leseraster. Bislang waren Gruppe I Introns noch nie in bakteriellen offenen Leserastern beschrieben worden. Alle CdlSt1 Varianten besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterscheiden sich aber in ihren IS-Element-Komponenten. Gruppe-I-Introns sind in der heutigen Zeit ihrem Vorkommen nach eher als eukaryote Elemente anzusehen. Insertionselemente sind dagegen klassische prokaryote Elemente, die in einer Vielzahl von Bakterien vorkommen. Mit CdlSt1 und seinen Varianten findet sich allerdings ein besonderer Vertreter der Gruppe I Introns. Es kann angenommen werden, dass die chimären Eigenschaften dieses Introns es ihm ermöglichen, sich den für Gruppe I Introns neuen Lebensraum der bakteriellen offenen Leseraster zu erschließen. Eine zentrale Bedeutung dürfte dabei die Mobilitätsvermittlung durch die potentielle Transposase TlpB haben. Mit einem Pentanukleotid als Erkennungssequenz sind ausreichend viele Integrationsstellen in offenen Leserastern gegeben, während konventionelle Introns, die statt Transposasen typischerweise Endonukleasen besitzen, aufgrund ihrer viel größeren Erkennungssequenz von 12-40 bp, hier einen Nachteil hätten. Zudem kommt es bei der Integration der durch Transposasen vermittelten Mobilität, die zur IS605 Familie gehören, zu keiner Sequenzduplikation oder Deletion. Der Intronanteil des chimären Elements ist für die Spleißaktivität maßgeblich, wodurch die Inaktivierung der Wirtsgene verhindert wird, die bei einer Integration von Insertionselementen normalerweise vorkommt. Die weite Verbreitung von CdlSt1 und seinen Varianten in der Spezies *Clostridium difficile* belegen den Erfolg im Zusammenwirken der beiden Komponenten. Damit ist CdlSt1 als egoistisches genetisches Element beschreibbar, dessen invasive Fähigkeiten aus der Symbiose des Intron-Anteils und des IS Element-

Anteils resultieren. Es ist die perfekte Adaption eines Gruppe I Introns auf bakterielle Gene. Dabei wird angenommen, dass der Mobilitätsmechanismus ursächlich dafür verantwortlich ist, dass *CdISt1* ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C. difficile*-Genom integriert. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich ist, steht noch aus.

Der Mechanismus der Mobilität des *CdISt1* ist von besonderer Bedeutung, da er sowohl die Häufigkeit des Springens des IStrons als auch den Ort der Integration maßgeblich bestimmt, ob es z.B. in einen ORF springt, dem Gen einer strukturellen RNA oder aber in nicht-kodierenden Regionen des Chromosoms. Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit konnten vier Arten des chimären genetischen Elements *CdISt1* gefunden werden: *CdISt1-0* (TlpA / TlpB), *CdISt1-I* (Δ TlpA / TlpB), *CdISt1-II* (TlpB), und *CdISt1-III* (Δ TlpB). Alle *CdISt1*-Varianten besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterscheiden sich aber in ihren IS-Element-Komponenten [185, 196]. Die *CdISt1-0*-Varianten kodieren für zwei komplette transposase-like Proteine (TlpA und TlpB) und scheinen damit ein fast vollständiges IS-Element der IS605 Familie zu besitzen. Es ist davon auszugehen, dass die *CdISt1-0*-Varianten, die im *C.-difficile*-Stamm SE918 entdeckt wurden (*CdISt1a*-SE918), der ursprünglichen Form des IStrons sehr nahekommen. Analysen der Sequenz und der Integrationsstellen mehrerer Varianten von *CdISt1-C34* zeigen, dass das IStron alle charakteristischen Merkmale eines IS605-Mechanismus besitzt [185, 197], wie z.B. dessen Mobilität. So kann man davon ausgehen, dass die IS-Element Komponente die Ausbreitung von *CdISt1* vermittelt, während die Intron-Komponente für das effiziente Spleißen der mRNA-Vorläufer verantwortlich ist. Durch die Fusion des Gruppe-I-Introns mit dem IS-Element wird dem IStron ein Mobilitätsmechanismus zur Verfügung gestellt, der auf die Verbreitung in prokaryonten Organismen spezialisiert ist [232]. Dabei wird angenommen, dass der Mobilitätsmechanismus ursächlich dafür verantwortlich ist, dass *CdISt1* ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C. difficile*-Genom integriert [185]. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich ist, steht noch aus.

Die Typ-II-Varianten, denen die Transposase TlpA fehlt, zeigen dass für die Mobilität von *CdISt1* nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Scheinbar werden mit der Deletion von TlpA eher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. In Typ-II-Varianten erfolgt das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0-Pairing,

dann aber über eine geringere Distanz, verbunden mit der Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur. Anhand dieser Ausführungen kann vermutet werden, dass das chimäre CdlSt1 ein evolutionsgeschichtlich jüngerer genetischer Element ist und die Typ-0-Variante mit den komplett erhaltenen Genen *tlpA* und *tlpB* die ursprüngliche IStron-Variante darstellen sollte. Die Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur und schnellere Spleißreaktionen im Vergleich zu den stark verlangsamten Spleißreaktionen im Fall der Typ-0-Variante stellt einen Selektionsvorteil für die verkürzten CdlSt1 dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Spleißreaktion des nativen Typ-0-IStrons deutlich langsamer abläuft, als es etwa bei Typ-I oder Typ-II-IStrons der Fall ist. Die Deletion des offenen Leserasters (Tlp B) aus dem Typ-III-IStron hat keinen Einfluss auf die Spleißaktivität, was für die Theorie spricht, dass das Molekül eine Chimäre aus einem Gruppe-I-Intron und einem Insertionselement ist [185]. Der Insertionselementanteil ist also für die korrekte und spezifische Spleißreaktion nicht unbedingt notwendig. Deletiert man weitere Nukleotide noch in 3'-Richtung, so dass der P9.2-Stem jetzt weniger als 28 nt von der 3'-Spleißstelle entfernt ist, treten noch viele andere Banden auf. Hier wird wahrscheinlich bei einem Teil der Moleküle das 3'-Exon abgespalten, bevor der nukleophile Angriff an der 5'-Spleißstelle stattfinden kann. Dadurch entsteht an der 3'-Spleißstelle eine freie 3'-Hydroxylgruppe, die an den Cyclisierungsstellen (bei den Nukleotiden 2 und 94 in 3'-Richtung von der 5'-Spleißstelle) angreifen kann [185].

Es ist möglich, dass durch das nur noch sehr kurze Verbindungsstück zwischen P9.2-Stem und dem 3'-Exon sterische Hinderungen auftreten. Das im Rahmen einer anderen Arbeit generierte Klon pTZ1d14, (hierbei wurde aus dem Typ-III-IStron ein Fragment von 173nt deletiert, ab 17nt hinter dem P9.2-Stem bis 15nt nach dem TlpB Rest), so dass die offenen Leseraster ganz entfernt wurden. Dieser Klon spleißt noch sehr gut und ist die kleinste, am 3'-Ende verkürzte Variante von CdlSt1, die noch gut spleißt. Diese Intronvariante kommt den Strukturen des Ursprungsintrons vor der Verschmelzung mit dem Insertionselementanteil wahrscheinlich sehr nahe. Der Klon ist mit einer Größe von nur 575 nt fast dreieinhalbmal kleiner als das zuerst gefundene Gruppe-I-Intron aus *C. difficile* CdlSt1a. Von der Größe her kommt es dem Gruppe-I-Intron aus *T. termophila* mit etwa 420 nt schon recht nahe. Eines der kleinsten, bekannten Gruppe-I-Introns ist eine Variante des sunY-Introns aus dem Phagen T4 (Green & Szostak, 1992) mit einer Größe etwa 200 nt. Diesem Intron fehlen bis auf

den P9 alle peripheren Anteile. *CdISt1* ähnelt vom Aufbau am meisten den Gruppe-1A2-Introns (mit ausgedehntem P9-Komplex und zwei Stems in der P7-Domäne). Es besitzt jedoch einen großen P5-Komplex und eine P2-Domäne wie Gruppe-1C1-Introns, zu denen zum Beispiel das Tetrahymena-Intron gehört. Außer dem hier untersuchten Intron ist noch keines beschrieben worden, das sowohl einen ausgedehnten P5-Komplex als auch eine ausgedehnte P7-Domäne hat. Die kleinsten gefundenen Introns gehören zu der Subgruppe 1A2 und besitzen alle keinen großen P5-Komplex.

5.1.1. IStron Typ-0-Variante

Basierend auf der IStron Typ-0-Variante sollte ein Modellsystem etabliert werden, mittels dessen der Mechanismus der Mobilität untersucht werden kann. Die *CdISt1-0*-Varianten kodieren für zwei komplette Transposase-like Proteine (TlpA und TlpB) und scheinen damit ein fast vollständiges IS-Element der IS605-Familie zu besitzen. Es ist davon auszugehen, dass die *CdISt1-0*-Varianten, die im *C. difficile*-Stamm SE918 entdeckt wurden (*CdISt1a-SE918*), der ursprünglichen Form des IStrons sehr nahekommen. Weiter kann man annehmen, dass die IS-Element-Komponente die Ausbreitung von *CdISt1* vermittelt, während die Intron-Komponente für das effiziente Spleißen der mRNA-Vorläufer verantwortlich ist. Durch die Fusion des Gruppe-1-Introns mit dem IS-Element wird dem IStron ein Mobilitätsmechanismus zur Verfügung gestellt, der auf die Verbreitung in prokaryonten Organismen spezialisiert ist [232]. Dabei wird angenommen, dass der Mobilitätsmechanismus ursächlich dafür verantwortlich ist, dass *CdISt1* ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C. difficile*-Genom integriert [185]. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich ist, steht noch aus. Mit einer rekombinanten/asymmetrischen PCR wurde zunächst aus dem Typ-0-Stron des *C. difficile*-Stamms SE918 ein Stopcodon entfernt, das bei nt 40 in *tlpA* liegt (TAA sollte zu →GAA mutiert werden). Der pCR2.1-TOPO-Vektor diente zunächst als Grundgerüst für die weiteren Arbeiten. Er kodiert sowohl für eine Ampicillin-, als auch über eine Kanamycin-Resistenz und verfügt weiterhin über ein *LacZ α* -Komplement, das beim Einsatz von X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion der Folgeklone genutzt werden kann (Nachweis der erfolgreichen Insertionsinaktivierung des *lacZ*-Gens). Unter Nutzung des T7-Promotors des Vektors war ferner der Einsatz von *in-vitro*-

Transkription möglich. Bei der Untersuchung der Spleißreaktion konnten wir zeigen, dass das IStron in Antisense-Orientierung zum T7-Promotor des pCR2.1-TOPO-Vektorkeine regulären Spleißprodukte generiert. Daher eigneten sich die Antisense-Orientierungen als Negativkontrollen zum Nachweis der regulären Spleißaktivität des IStrons. Mit dieser Zielsetzung wurden auch die Antisense-Konstrukte in pTZ19R erzeugt und isoliert.

5.1.2. Einfluss von Punktmutationen in den peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1

Bei Gruppe-I-Introns werden bei der Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur konservierte, für den Spleißprozess notwendige, Nukleotide oder Nukleotid-Abfolgen in exakt definierten Positionen angeordnet. Die exakte Positionierung ist die Voraussetzungen zum Aufbau der für die Katalyse notwendigen Tertiärstruktur des Introns [163]. Neben dem katalytischen Kern (Domänen P3-P8) existieren weniger stark konservierte periphere Domänen (P1, P2 und P9), die optional offene Leseraster (ORF) enthalten können. Diese ORFs kodieren entweder für Maturasen oder Endonukleasen, die am Spleißprozess beteiligt sind und dem Intron die Mobilität ermöglichen [176, 184]. Als Zielstruktur für die Integration des *catP*-Gens schienen daher insbesondere die peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 geeignet, da die Integration des *catP*-Gens in diesen Loop die Struktur und Stabilität des IStrons nicht negativ beeinflussen sollte. Zur Integration des *catP*-Gens wurden eine NcoI-Restriktions-Schnittstelle in P2- und P9.1-Stem-Loop des Typ-0-IStrons CdIst1a-SE918 eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die eingeführte NcoI-Restriktionsschnittstelle in P2- bzw. P9.1-Stem-Loop keinen Einfluss auf die Spleißaktivität des IStrons ausübt und dabei reguläre Spleißprodukte entstehen. Die Spleißreaktion wird von der nativen Typ-0-Variante ausgeführt, ist aber auch im Fall der neuen „NcoI-Konstrukte“ stark verlangsamt. Demnach haben die NcoI-Schnittstellen weder in P2- noch in P9.1-Loop einen bedeutenden Einfluss auf die Spleißaktivität.

5.2. Chloramphenicol-Resistenz Gen *catP* als Markergen

Zur Untersuchung der Mobilität musste in das IStron ein geeignetes Markergen eingeführt werden, das zur Selektion von neu generierten Klonen genutzt werden

konnte. Als Resistenzmarker zu Selektion wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *catP* (Chloramphenicolacetyltransferase) aus *C. perfringens* ausgewählt. Die als Reporter gen verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase ermöglicht über eine Chloramphenicol-Selektion die Überprüfung der Funktion der Konstrukte. Chloramphenicol diffundiert durch die bakterielle Plasmamembran und bindet an die ribosomale 50S-Untereinheit. Es kommt zur Blockade der Aminoacyl-tRNA Akzeptorstelle und damit zur Blockade der Proteinbiosynthese. Das Antibiotikum kann sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid wirken. Die Resistenz von Bakterien gegenüber Chloramphenicol beruht auf einer Inaktivierung des Antibiotikums durch Acetylierung. Die inaktivierend wirkende Chloramphenicolacetyltransferase, ist ein Tetramer aus identischen Untereinheiten der molaren Masse von 23-25 kDa. Der Reaktionsmechanismus der Inaktivierung, dargestellt in Abbildung 5.1 beinhaltet insbesondere eine Acetylierung des Chloramphenicols in Position C3. Das dabei gebildete 3-Acetoxy-Chloramphenicol ist bereits wirkungslos. Durch eine intramolekulare Umlagerung kann die Acetylgruppe auf die C1-Position übertragen werden, so dass in einer weiteren enzymatischen Reaktion die C3-Position erneut acetyliert werden kann.

Abb. 5.1

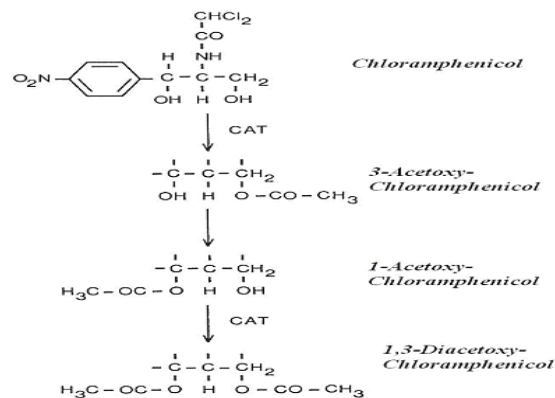


Abb. 5.1 Inaktivierung des Chloramphenicols durch die Chloramphenicolacetyltransferase
Nach Acetylierung in Position C3 kommt es zur intramolekularen Umlagerung der Acetylgruppe auf die C1-Position, wodurch die C3-Position nochmals enzymatisch acetyliert werden kann (Quelle: Biologie Bakterieller Plasmide, S168, W. Schumann).

5.2.1. Einfluss des *catP*-Gens in P2- und P9.1-Stem-Loop

Im Rahmen der Aufnahme eines Selektionsmarkers war es wichtig, dass die Integration des *catP*-Gens in das IStron die Funktionalität nicht stört, insbesondere, dass es die Intron-Komponente nicht maßgeblich beeinflusst. Als Zielstruktur für die Integration des *catP*-Gens wurden die peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 gewählt, da die Integration des *catP*-Gens in diesen Loop die Struktur und Stabilität des IStrons nicht negativ beeinflussen sollte. Zur Integration des *catP*-Gens wurden eine NcoI-Restriktions-Schnittstelle in P2- und P9.1-Stem-Loop des Typ-0-IStrons CdlSt1a-SE918 eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die eingeführte NcoI-Restriktionsschnittstelle in P2- bzw. P9.1-Stem-Loop keinen Einfluss auf die Spleißaktivität des IStrons ausübt und dabei reguläre Spleißprodukte entstehen. Weiter konnte gezeigt werden, dass das im P2- und P9.1-Loop eingeführte 790nt große *catP*-Gen ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität des Spleißvorganges hatte (3.2).

5.3. *Listeria innocua* als Modell-Organismus

Die Untersuchungen zur Mobilität des IStrons können selbst nicht in *C. difficile* durchgeführt werden, da in allen bisher untersuchten *C.-difficile*-Stämme zumindest eine Kopie des IStrons enthalten ist [185]. Als gut geeignete Alternative zu *C. difficile* eignet sich der apathogene Keim *Listeria innocua*, der ein ähnliches Codon-Usage wie *C. difficile* besitzt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass in *L. innocua* die beiden IStron kodierten, potentiellen Transposasen TlpA und TlpB exprimiert werden sollten. Ein weiterer Grund für die Wahl von *L. innocua* als Modell-Organismus lag darin, dass für diesen Keim mit dem Suizidplasmid pAUL-A ein Derivat der pE194 Familie von Suizidplasmiden mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori) verfügbar war [233]. Dieser Vektor enthält sowohl Regulationssequenzen für Gram(+)-Bakterien als auch für *E. coli* [233] (Abb.5.2). Die Klonierungsschritte können bei diesem Vektor in *E. coli* durchgeführt werden, was die Klonierungen wesentlich vereinfachen sollte.

Abb. 5.2

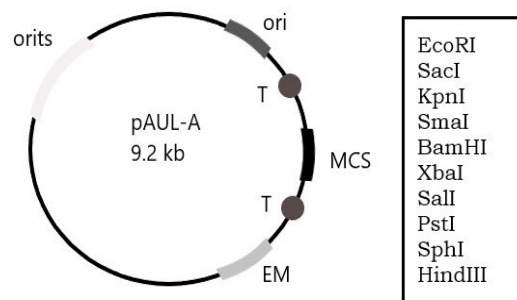


Abb. 5.2 Schematische Darstellung des SuizidplasmidspAUL-A Darstellung nach Schäferkordt&Chakraborty 1995[233]; MCS=multiple cloning site; ori= originofreplikation; orits= originofreplikation in gram(+)-Bakterien; EM= Erythromycin Resistenz-Gen; die Pfeile markieren die beiden singulären Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall über die wir das IStron-Konstrukt in den Plasmid pAUL-A einklonieren.

5.3.1 Generierung und Einklonieren des p23-Promotors

Mit den Plasmid pMO-2 und pMO-2(-) und den verschiedenen Typ-0-Konstrukten [IStron(+)-P2catP+, IStron(+)-P2catP-, IStron(-)-P2catP+, IStron(-)-catP-, IStron(+)-P9.1catP+, IStron(+)-P9.1catP-, IStron(-)-P9.1catP+, IStron(-)-P9.1catP-] sind Konstrukte mit modifizierten IStrons generiert, auf die mit Hilfe des integrierten catP-Gens (in P2- und P9.1-Loop) selektioniert werden konnte. Für die Transkription von Genen in *L. innocua* musste ein für Gram(+)-Bakterien geeigneter Promotor einkloniert werden. Hierfür wurde der p23-Promotor in selber Orientierung zum IStron-Konstrukt eingefügt. Der p23-Promotor wurde aus dem Plasmid pLATO-Rep-p23, der einen p23-Promotor besitzt, mobilisiert und entsprechend über „Forced Cloning“ in die Varianten der Plasmide pMO-2 und pMO-2(-) ligiert. Die derart auf der Basis von pMO-2 und pMO-2(-) generierten Plasmide, mit dem in Serie vorgeschalteten p23-Promotor, wurden als pMO-3 bezeichnet. Bei pMO-3(-) handelt es sich erneut um Antisense-orientierte IStron-Konstrukte.

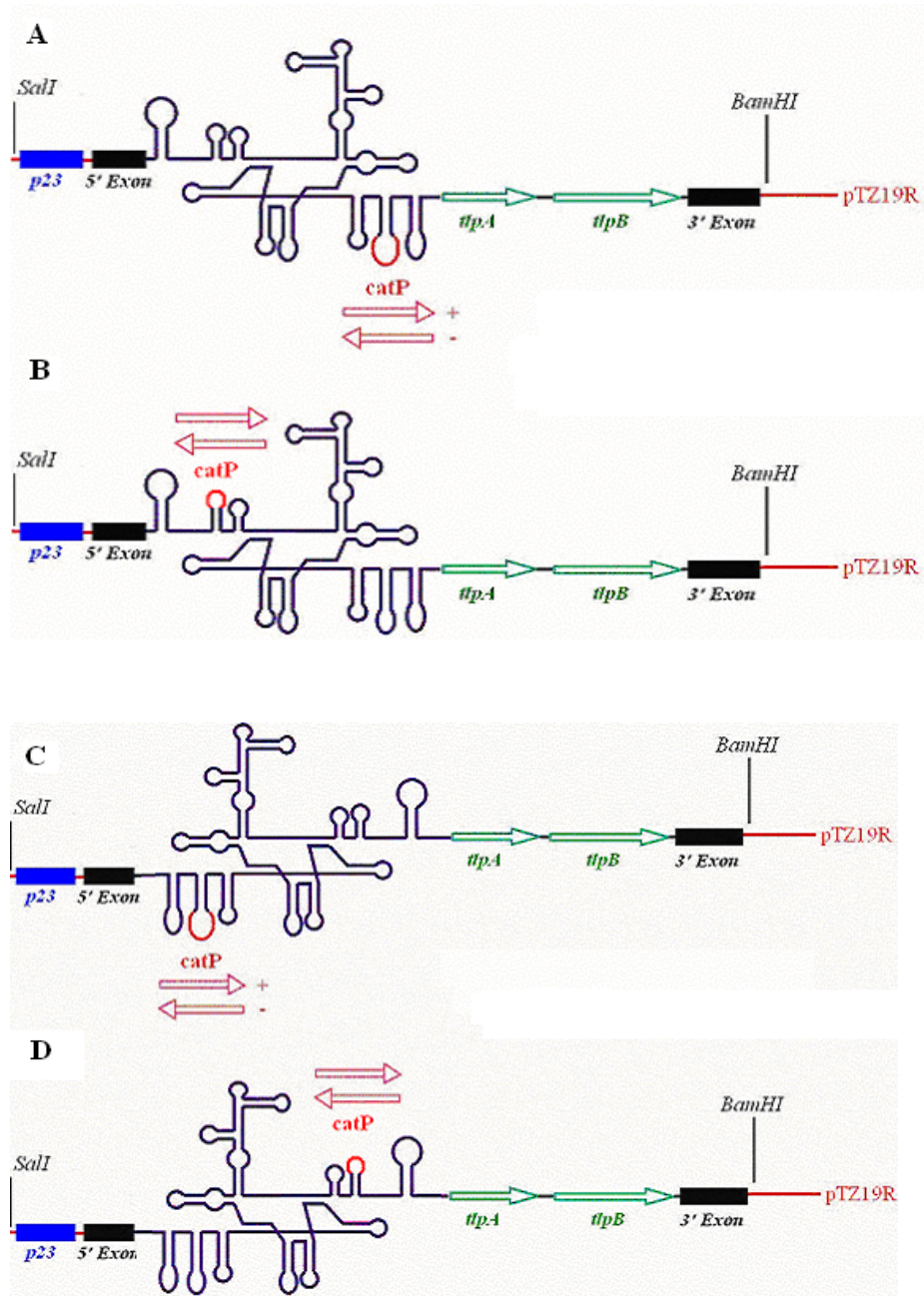
Da die Mobilität höchstwahrscheinlich von den Transposasen TlpA und TlpB vermittelt wird, waren im Vergleich zu den vollständigen IStrons geeignete Negativkontrollen erforderlich. Dazu wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCRs Deletionen in dem IS-Element Anteil des IStrons Typ 0 induziert, um aus den Konstrukten p23-IStron(+)-P2catP(+), p23-IStron(+)-P2catP-, p23-IStron(+)-P9.1catP+ und p23-IStron(+)-P9.1catP- analoge „Typ-III-Varianten“ zu erzeugen. In einer ersten PCR wurden zwei Teilfragmente des IStron-catP-p23-Konstrukts hergestellt, in denen der IS-Element-Anteil deletiert war.

In *C. difficile* sind mehrere Kopien des IStron vorhanden, die über ein komplett erhaltenes tlpB-Gen verfügen. Dies gilt insbesondere für die Typen 0, I und II. Wegen solcher Mehrfachkopien entsteht die Problematik, dass Transpositionen aus cis- oder aus trans-Stellung induziert werden könnten. In *C. difficile* könnten Transposasasen aus benachbarter cis- oder entfernter trans-Stellung anderer IStrons bereitgestellt werden. Frühere Studien zu anderen transposablen Elementen haben gezeigt, dass Transpositionen effizienter werden, wenn die Transposase durch das Element selbst gebildet wird, oder wenn das Transposase-Gen in der Nähe oder gar auf dem gleichen DNA-Molekül vorliegt. Die Bevorzugung einer solchen cis-Aktivität reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass Transposase-Expression, ausgehend von einem beliebigen Element, die Aktivierung der Transposition einer Kopie an anderer Stelle im Genom induziert.

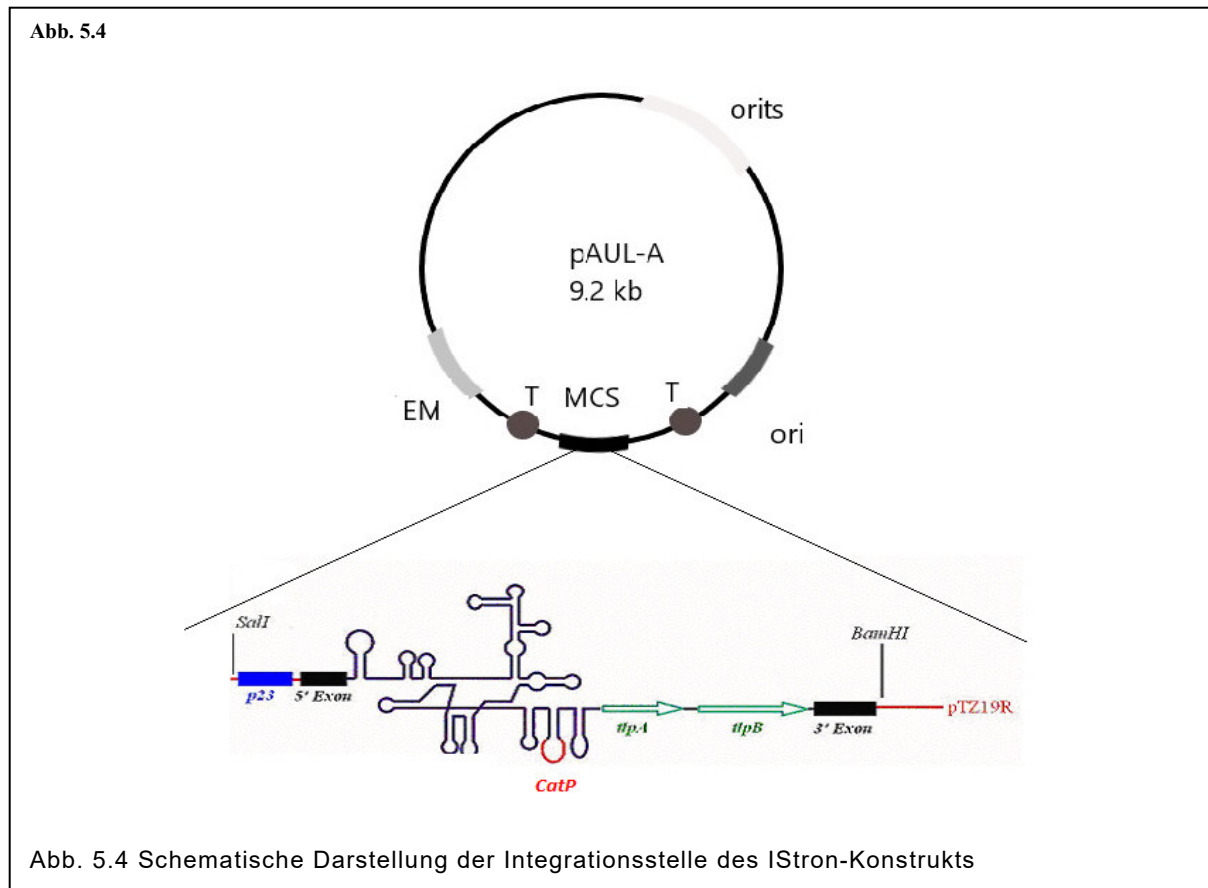
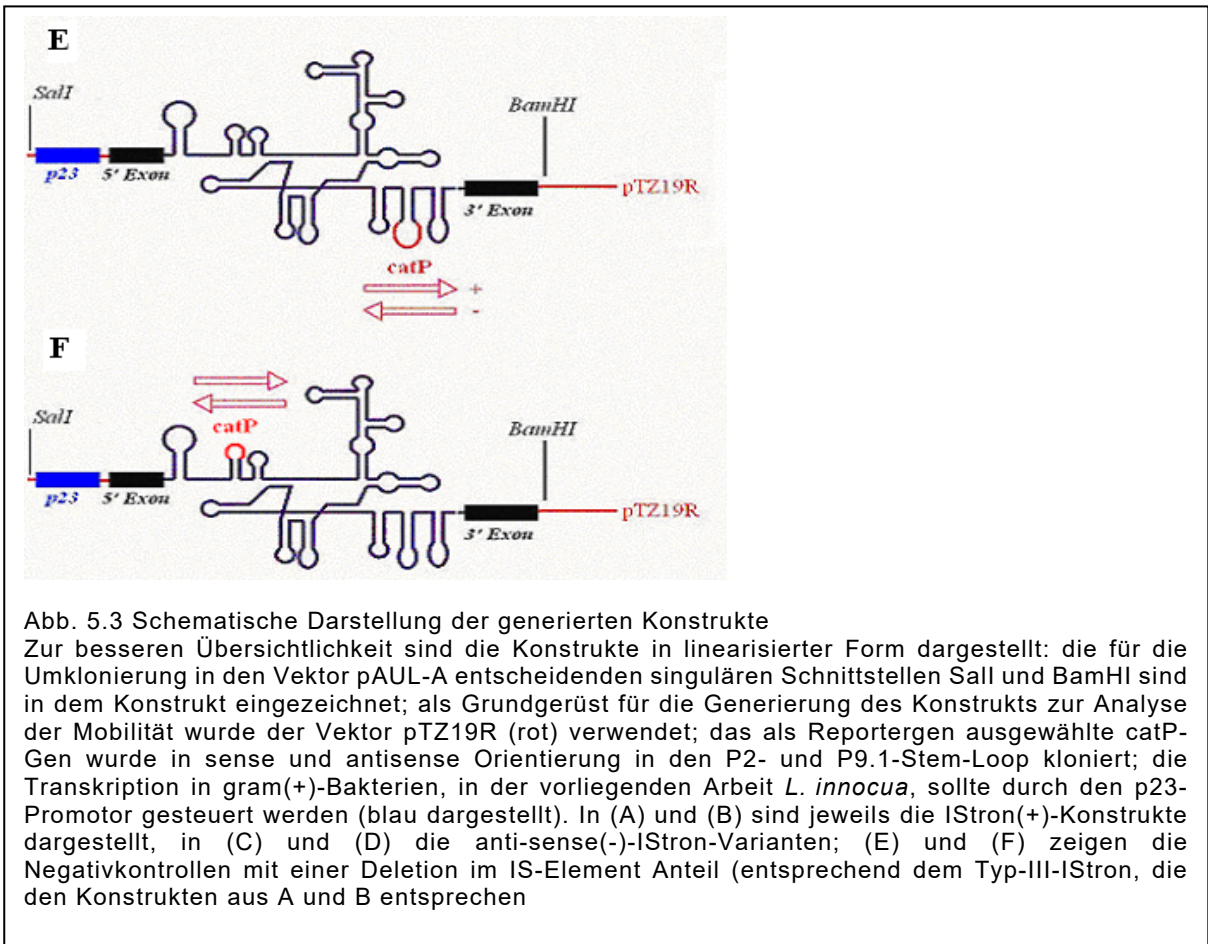
Beim hier geplanten Mobilitätsassay in *L. innocua* entfällt diese Schwierigkeit. Es ist egal ob die Transposition aus cis- oder trans-Stellung abläuft, weil es in *L. innocua* nur die eine Art der IStrons und keine weiteren IStron-Varianten geben wird. Damit sind die Typ-III-Varianten der generierten Konstrukte geeignete Negativkontrollen für die Transposaseaktivität (Abb. 5.3).

Zum Umklonieren wurden die IStron-catP-Konstrukte aus dem Plasmid pMO-3 über die beiden singulären Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall mobilisiert und in das ebenfalls BamHI-Sall verdaute Plasmid pAUL-A ligiert. Das so entstandene Plasmid (pAUL-A + IStron-Konstrukt) wurde als pMO-4 bezeichnet.

Abb. 5.3



Weiter auf nachfolgender Seite



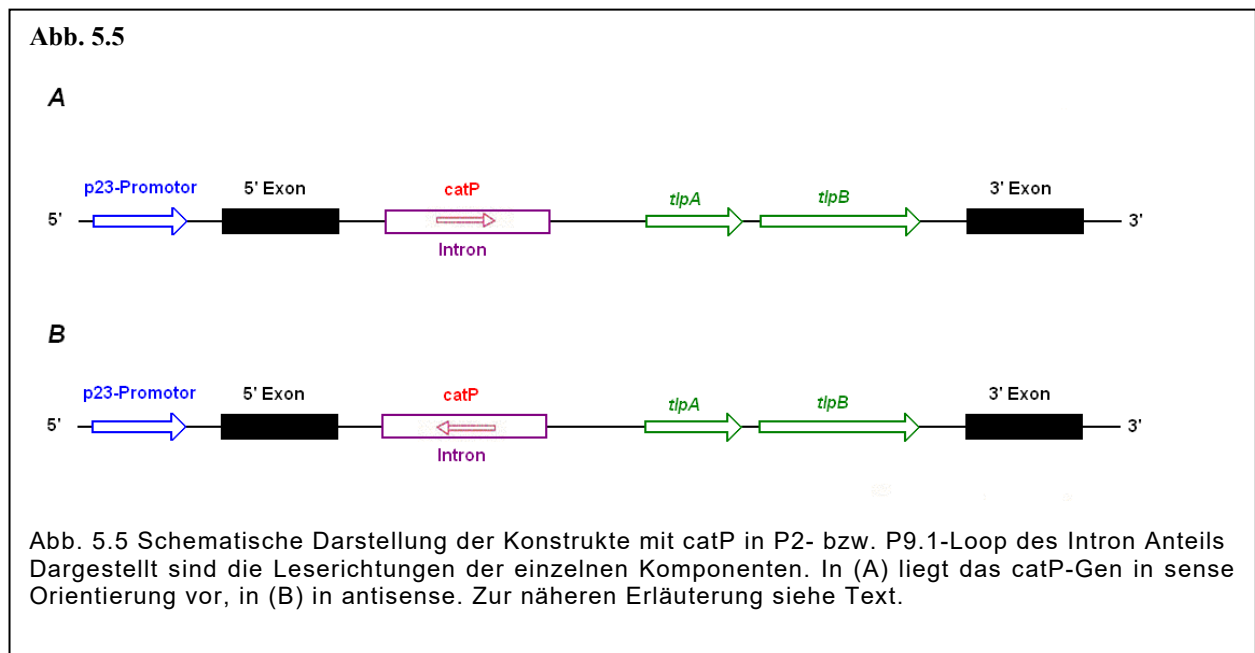
5.3.2. Funktionalität des p23-Promotor und Expression des catP-Gen in *L. innocua*

Die erste und essentielle Frage, die es zu beantworten galt, war, ob die als Reporter gen verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase (das catP-Gen) in *L. innocua* transkribiert wird. Das hängt insbesondere davon ab, ob der p23-Promotor in *L. innocua* funktionell exprimiert wird. Für *L. innocua* waren diesbezüglich keine Daten veröffentlicht. Daher musste zunächst die Funktionalität des catP-Gens in vivo in *L. innocua* nachgewiesen werden. Das Plasmid pMO4 (pAUL-A + IStron-Konstrukt), das sich im Suizidvektor pAUL-A befand, wurde über Protoblasten-Transformation in *L. innocua* transformiert.

Um die Funktion der Resistenz in *L. innocua* zu beurteilen, wurde das Bakterienwachstum in Brain-Heart-Infusion mit aufsteigender Chloramphenicol-Konzentration getestet. Für Listerien, die unter Selektionsdruck wachsen sollen, wird in der Literatur eine Chloramphenicol-Konzentration von 5-10 µg/ml angegeben. Daher wurde auf Brain-Heart-Infusion-Chloramphenicolplatten bei einer Konzentration von 5 und 10 µg/ml getestet. Inkubiert wurde bei 30°C und 37°C also, im Fall der Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, unter plasmidreplizierenden Bedingungen. Beim Wildtyp konnte kein sichtbares Wachstum beobachtet werden, weder bei 5 noch bei 10 µg/ml. Bei den Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, war sowohl bei einer Konzentration von 5 µg/ml als auch bei einer Konzentration von 10 µg/ml ein deutliches Wachstum zu beobachten. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis erbracht das catP-Gen in *L. innocua* funktionell transkribiert und exprimiert wird (3.3.5 und 3.3.6).

Der Nachweis des Wachstums von *L. innocua* bei Gegenwart von Chloramphenicol zeigte, dass catP als Reporter gen für Experimente in *L. innocua* gut geeignet ist. Im Fall der Bezeichnung catP+ liegen der p23-Promotor und das Reporter gen in derselben Orientierung vor, im Fall von catP- sind die Leserichtungen entgegengesetzt. Das catP besitzt keinen Terminator; und auch das Konstrukt enthält keinen Stop-Codon, so dass man davon ausgehen konnte, dass bei nachgewiesener Transkription des catP-Gens auch tlpA und tlpB transkribiert werden. Damit sollten die Transposasen TlpA und TlpB in ausreichender Konzentration gebildet werden (Abb. 5.5). Bei catP- Konstellation sollte die Transkription von tlpA und tlpB nicht initiiert,

sondern eher behindert werden. Die *catP*-Konstrukte wurden daher als Negativkontrollen eingesetzt.



5.4 Wachstumskontrolle in Flüssigmedium

5.4.1 Plasmid-replizierenden Bedingungen

Um die Funktion der Resistenz in *L. innocua* zu beurteilen, wurde das Bakterien-Wachstum in Brain-Heart-Infusion-Flüssigmedium mit aufsteigender Chloramphenicol-Konzentration getestet. Der Wildtyp zeigt sich als deutlich sensibel gegenüber Chloramphenicol. Das Wachstum in Gegenwart von Chloramphenicol war schon bei niedrigen Antibiotika-Konzentrationen deutlich gehemmt.

Es wurde auf Brain-Heart-Infusion-Chloramphenicolplatten bei einer Konzentration von 5 und 10 µg/ml getestet. Inkubiert wurde bei 30°C und 37°C also, im Fall der Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, unter plasmidreplizierenden Bedingungen. Beim Wildtyp konnte kein sichtbares Wachstum beobachtet werden, weder bei 5 noch bei 10 µg/ml. Bei den Listerien, die das Plasmid pMO-4 tragen, war sowohl bei einer Konzentration von 5 µg/ml als auch bei einer Konzentration von 10µg/ml ein deutliches Wachstum zu beobachten. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde der

Nachweis erbracht, dass das *catP*-Gen in *L. innocua* funktionell transkribiert und exprimiert wird. Bei *L. innocua*, die das konstruierte Plasmid pMO-4 tragen, und bei 42°C kultiviert wurden, also bei Temperaturen, die eine Replikation des Suizidplasmids nicht erlauben, konnte kein Wachstum beobachtet werden.

5.4.2 Plasmid-nicht-replizierenden Bedingungen

Um die Mobilität der IStrons zu untersuchen, werden die Listerien, die das konstruierte Plasmid pMO-4 tragen, bei 42°C kultiviert, also bei Temperaturen, die eine Replikation des Suizidplasmids nicht erlauben.

Gleichzeitig wurde durch Chloramphenicol ein Selektionsdruck ausgeübt. Unter diesen Umständen sollten nur die Bakterienzellen überleben, bei denen das IStron-*catP* Konstrukt in das Chromosom gesprungen war und von dort aus aktiv wurde. Für das weitere Vorgehen sind zwei Punkte entscheidend. Erstens ist das Springen des IStrons in das Listerien-Genom, statistisch gesehen, ein eher seltenes Phänomen. Zweitens muss man berücksichtigen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterien von der „molekularbiologischen Funktion“ (funktionelle Expression) von verschiedenen Faktoren abhängt. Bakterien, die über Plasmid-vermittelte Resistenzen verfügen, wachsen schneller als solche, die auf Genom-vermittelte Resistenzen zurückgreifen.

5.5 Hypothese zur Entstehung von *CdISt1*

Die Identität des IStrons konnte bis heute nicht geklärt werden. Allerdings legt der charakteristische chimäre Aufbau von *CdISt1* die Vermutung nahe, dass sich das Ribozym aus zwei Vorläuferkomponenten entwickelt hat zum einen aus einem Vorläufer des Gruppe-I-Introns, zum anderen aus einem IS-Element-Vorläufer. Man geht davon aus, dass der Gruppe-I-Intron-Vorfahre in das *tlpA*-Gen des IS Element-Vorläufers inseriert sein könnte, und über die Ausbildung einer stabilen P9.0-Paarung könnte sich dann das chimäre Gruppe-I-Intron *CdISt1* manifestiert haben [185]. Da in *C. difficile* bislang weder die Vorläuferelemente noch rudimentäre Fragmente von ihnen detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass das Intron *CdISt1* über horizontalen Gentransfer zu dem heutigen Wirt gelangt ist. Im Ergebnis besteht *CdISt1*

aus einer vollständigen Intron-Komponente und einer unvollständigen IS-Element-Komponente. Der ursprüngliche Aufbau des IS-Elements ist bei der Entstehung des chimären Ribozyms bis auf die IStron-Typ-0-Varianten zerstört worden.

Das Intron CdlSt1 und seine Varianten verkörpern allerdings nicht diese Ursprünglichkeit der Gruppe-I-Introns. Wie vorhergehend beschrieben, ist CdlSt1 sehr wahrscheinlich aus der Fusion zweier Vorläufer-Komponenten entstanden. Da es nicht grundsätzlich im Genus Clostridium, sondern ausschließlich in *C. difficile* vorzufinden ist, erscheint ein Vorkommen des Introns im gemeinsamen Vorfahren der Clostridien als eher unwahrscheinlich. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass das Intron über horizontalen Gentransfer in den *C. difficile* Vorläufer gelangt ist und sich dort etablieren konnte. Einen weiteren Hinweis darauf, dass CdlSt1 erst in der jüngeren Evolutionsgeschichte entstanden ist, das Vorliegen in verschiedenen IStron-Varianten. Die Typ-II-Variante, bei dem die Transposase TlpA fehlt, zeigt, dass für die Mobilität von CdlSt1 nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Mit der Deletion von TlpA würden daher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. Das hätte zur Folge, dass das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0-Pairing über eine weniger große Distanz erfolgt, womit die Stabilität der Intronstruktur erhöht wäre. Diese nachhaltige Veränderung deutet darauf hin, dass CdlSt1 ein evolutionsgeschichtlich neues genetisches Element ist und die Typ-0-Variante mit den komplett erhaltenen Genen *tlpA* und *tlpB* die ursprünglichste IStron-Variante darstellt. Wäre das IStron ursprünglicher Natur, so hätten sich die optimierten Varianten wesentlich stärker durchgesetzt und Unterschiede wären lediglich auf Punktmutationen beschränkt.

5.6 Die Rolle von CdlSt1 in der „Introns early“- und „Introns late“-Kontroverse

CdlSt1 ist ein neuartiges, genetisches Element und das erste, in eubakteriellen Genen gefundene Intron. Es handelt sich dabei um ein chimäres genetisches Element, das typische Merkmale von zwei genetischen Elementen aufweist [185]. Nachdem De Souza und W. Gilbert einen plausiblen Erklärungsansatz in der Debatte um die „Introns Early“- und „Introns Late“-Theorien vorbringen konnten [64], stellte sich die Frage, wie sich das Gruppe-I-Intron CdlSt1 in dieses Konzept einordnen lässt. Nach De Souza

und W. Gilbert sind ungefähr ein Drittel aller Introns ursprünglich und folgen daher Konventionen, wie sie in der „Introns Early“-Theorie vorgegeben werden [55-57]. Die verbleibenden zwei Drittel der Introns sind erst später im Verlauf der Evolution in Gene inseriert und sind damit konform zur „Introns Late“-Theorie [58-60]. Für CdlSt1 und seine Varianten kann es als gesichert angesehen werden, dass es sich nicht um ein ursprüngliches Intron gemäß der „Introns Early“-Theorie handelt. Wie bereits ausführlich erörtert, stellt CdlSt1 einen neuen Typus von Gruppe-I-Introns dar, der aus einer Intron-Komponente und einer IS-Element-Komponente besteht. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass eine fortschreitende strukturelle Optimierung dieses Gruppe-I-Introns stattfindet. Bislang konnten vier Arten des chimären genetischen Elements CdlSt1 gefunden werden: CdlSt1-0 (TlpA / TlpB), CdlSt1-I (Δ TlpA / TlpB), CdlSt1-II (TlpB), und CdlSt1-III (Δ TlpB) (Abb.3.1). Alle CdlSt1-Varianten besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron Komponente, unterscheiden sich aber in ihren IS-Element Komponenten [185, 196]. Die Deletion des offenen Leserasters (Tlp B) aus dem Typ-III-ISTRON hat keinen Einfluss auf die Spleißaktivität, was für die Theorie spricht, dass das Molekül eine Chimäre aus einem Gruppe-I-Intron und einem Insertionselement ist. Der Insertionselementanteil ist also für die korrekte und spezifische Spleißreaktion nicht unbedingt notwendig. Es ist davon auszugehen, dass die CdlSt1-0-Varianten, die im C.-difficile-Stamm SE918 entdeckt wurden (CdlSt1a-SE918), der ursprünglichen Form des ISTRONS sehr nahekommen. Die Typ-II-Varianten, denen die Transposase TlpA fehlt, zeigen, dass für die Mobilität von CdlSt1 nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Scheinbar werden mit der Deletion von TlpA eher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. In Typ-II-Varianten erfolgt das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0-Pairing, dann aber über eine geringere Distanz und verbunden mit der Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur. Die Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur und schnellere Spleißreaktionen im Vergleich zu den stark verlangsamten Spleißreaktionen im Fall der Typ-0-Variante stellt einen Selektionsvorteil für die verkürzten CdlSt1 dar.

Im Falle von CdlSt1 trifft die „Introns Late“-Theorie zu, die von einer Insertion in bestehende Gene ausgeht. Neben seiner Klassifizierung als evolutionsgeschichtlich neues mobiles genetisches Element und der voneinander unabhängigen Verteilung in verschiedene Gene, ist der Wirt an sich hier ebenfalls anzuführen. CdlSt1 ist das erste in eubakteriellen Genen gefundene Intron. Hätte hier die „Introns Early“-Theorie

bestand, so würde das bedeuten, dass alle Eubakterien dieses Intron im Laufe der Evolution eliminiert hätten, nur *C. difficile* nicht. Das erscheint wenig plausibel, womit von der Gültigkeit der „Introns-Late“-Theorie für Introns der CdISt1-Gruppe auszugehen ist.

6 Zusammenfassung

In offenen Leseraster von *Clostridium difficile* wurde ein neuartiges genetisches Element lokalisiert, das als CdlSt1 bezeichnet wurde und einen chimären Aufbau aus einem Gruppe-I-Intron und dem IS-Element der IS605 Familie aufweist. CdlSt1 konnte in mehreren Kopien in allen untersuchten *C. difficile* Stämmen nachgewiesen werden. In anderen clostridialen Spezies konnte das Gruppe I Intron bislang nicht vorgefunden werden. Der Integrationsort in *C. difficile* war in allen untersuchten Fällen immer ein offenes Leseraster. Bislang waren Gruppe I Introns noch nie in bakteriellen offenen Leserastern beschrieben worden. Alle bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen CdlSt1 Varianten besaßen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterschieden sich aber in ihren IS-Element-Komponenten [185, 196]. Es konnten vier Typen des chimären genetischen Elements CdlSt1 unterschieden werden: CdlSt1-0 (TlpA / TlpB), CdlSt1-I (Δ TlpA / TlpB), CdlSt1-II (TlpB), und CdlSt1-III (Δ TlpB). Alle CdlSt1 Varianten besitzen eine vollständige und funktionelle Gruppe-I-Intron-Komponente, unterscheiden sich aber in ihren IS-Element-Komponenten. Die CdlSt1-0-Variante, die in *C. difficile*-Stamm SE918 entdeckt wurde (CdlSt1a-SE918), kodiert für zwei komplette transposase-like Proteine (TlpA und TlpB) und scheint damit ein fast vollständiges IS-Element der IS605 Familie zu besitzen. Die Typ-II-Varianten, denen die Transposase TlpA fehlt, zeigen, dass für die Mobilität von CdlSt1 nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Scheinbar werden mit der Deletion von TlpA eher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. In Typ-II-Varianten erfolgt das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0-Pairing, dann aber über eine geringere Distanz, verbunden mit der Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass die Spleißreaktion des nativen Typ 0 IStrons deutlich langsamer abläuft, als es etwa bei Typ-I oder Typ-II-IStrons der Fall ist. Die Erhöhung der Stabilität der Intron-Sekundärstruktur und schnellere Spleißreaktionen im Vergleich zu den stark verlangsamten Spleißreaktionen im Fall der Typ-0-Variante stellen einen Selektionsvorteil für die verkürzten CdlSt1 dar. Anhand dieser Ausführungen kann vermutet werden, dass das chimäre CdlSt1 ein evolutionsgeschichtlich jüngerer genetischer Element ist und die Typ-0-Variante mit den komplett erhaltenen Genen *tlpA* und *tlpB* die ursprüngliche IStron-Variante darstellen sollte.

Gruppe-I-Introns sind in der heutigen Zeit ihrem Vorkommen nach eher als eukaryonte Elemente anzusehen. Insertionselemente sind dagegen klassische prokaryonte Elemente, die in einer Vielzahl von Bakterien vorkommen. Mit CdlSt1 und seinen Varianten findet sich allerdings ein besonderer Vertreter der Gruppe I Introns. Es kann angenommen werden, dass die chimären Eigenschaften dieses Introns es ihm ermöglichen, sich den für Gruppe I Introns neuen Lebensraum der bakteriellen offenen Leseraster zu erschließen. Eine zentrale Bedeutung dürfte dabei die Mobilitätsvermittlung durch die potentielle Transposase TlpB haben. Mit einem Pentanukleotid als Erkennungssequenz sind ausreichend viele Integrationsstellen in offenen Leserastern gegeben, während konventionelle Introns, die statt Transposasen typischerweise Endonukleasen besitzen, aufgrund derer viel größeren Erkennungssequenz von 12-40 bp, hier einen Nachteil hätten. Zudem kommt es bei der Integration der durch Transposasen vermittelten Mobilität, die zur IS605 Familie gehören, zu keine Sequenzduplikation oder Deletion. Der Intronanteil des chimären Elements ist für die Spleißaktivität maßgeblich, wodurch die Inaktivierung der Wirtsgene verhindert wird, die bei einer Integration von Insertionselementen normalerweise vorkommt. Die weite Verbreitung von CdlSt1 und seinen Varianten in der Spezies *Clostridium difficile* belegen den Erfolg im Zusammenwirken der beiden Komponenten. Damit ist CdlSt1 als egoistisches genetisches Element beschreibbar, dessen invasive Fähigkeiten aus der Symbiose des Intron-Anteils und des IS Element-Anteils resultieren. Es ist die perfekte Adaption eines Gruppe I Introns auf bakterielle Gene. Es wird angenommen, dass der Mobilitätsmechanismus ursächlich dafür verantwortlich ist, dass CdlSt1 ausschließlich in transkriptionsaktive Gene im *C. difficile*-Genom integriert. Der definitive Nachweis, dass der IS-Element-Anteil für die Mobilität des IStrons verantwortlich ist, steht noch aus.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die für die detaillierte Analyse des Mechanismus der Mobilität nötigen IStron Typ-0-Konstrukte zu generieren und deren Funktionalität in vitro nachzuweisen. Zudem sollte *L. innocua* als in vivo Model-Organismus genutzt werden. Dieses Ziel sollte durch folgende Zwischenschritte erreicht werden. Zunächst die Herstellung von Typ-0-IStron Varianten, die modular einsetzbar sein sollten – unter anderem Entfernung eines Stopcodons. Einführung von Klonierungsstellen und Einklonierung eines Markergens. Herstellung von „Paaren – positiv/negativ Kontrollen für in-vitro Untersuchungen. Die Nutzung des Suizidplasmids pAULA-A als Transfervehikel in einen lebenden Organismus und der

Einsatz der hergestellten molekulargenetischen Konstrukte in in-vivo Experimente in *Listeria innocua* als Modellbakterium.

Mit einer rekombinanten/asymmetrischen PCR wurde zunächst aus dem Typ-0-IStrom des *C.-difficile*-Stamms SE918 ein Stop-Codon bei nt 40 in *tlpA* entfernt (Mutation TAA zu \rightarrow GAA). Das so veränderte IStrom wurde dem TA-Cloning zugeführt und die neuen Konstrukte anschließend sequenziert. Es wurden mutationsfreie Klone ausgewählt, um damit die weiteren genetischen Veränderungen zu etablieren. Der pCR2.1-TOPO-Vektor diente als Grundgerüst für alle nachfolgenden Arbeiten. Der T7-Promotor des Vektors wurde für die *in-vitro-Transkription* genutzt. Für das weitere Vorgehen war die Orientierung des IStrom im pCR2.1-TOPO-Vektor wichtig. Das IStrom sollte in Sense-Orientierung zum T7-Promotor vorliegen. Dabei zeigte sich, dass das IStrom bei Antisense-Orientierung in Bezug auf den T7-Promotor des pCR2.1 keine regulären Spleißprodukte generierte. Entsprechende Konstrukte mit Antisense-Orientierung wurden im Folgenden als Negativ-Kontrollen für die reguläre Aktivität des IStroms eingesetzt. Als nächster Schritt wurde in das IStrom ein Markergen eingeführt, das zur Selektion von neu generierten Klonen genutzt werden konnte. Als Resistenzmarker zur Selektion wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *catP* (Chloramphenicolacetyltransferase) aus *C. perfringens* ausgewählt. Im Rahmen der Einklonierung eines Selektionsmarkers in CdlSt-1 war es wichtig, dass die Integration des *catP*-Gens in das IStrom dessen Funktionalität nicht stört, insbesondere, dass die Intron-Komponente nicht maßgeblich beeinflusst wird. Bei Gruppe-I-Introns wurden bei der Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur konservierte, für den Spleißprozess notwendige Nukleotide oder Nukleotid-Abfolgen in exakt definierte Positionen angeordnet. Die exakte Positionierung gilt als Voraussetzungen zum Aufbau der für die Katalyse notwendigen Tertiärstruktur des Introns [163]. Neben dem katalytischen Kern des CdlST-1 (Domänen P3-P8) existieren weniger stark konservierte periphere Domänen (P1, P2 und P9), die optional offene Leseraster (ORF) enthalten können. Es war bekannt, dass diese ORFs entweder für Maturasen oder Endonukleasen kodieren, die am Spleißprozess beteiligt sind und dem Intron die Mobilität ermöglichen [176, 184]. Als Zielstruktur für die Integration des *catP*-Gens wurden in der vorliegenden Arbeit die peripheren Stem-Loop-Strukturen P2 und P9.1 gewählt, da die Integration des *catP*-Gens in diesen Loops die Struktur und Stabilität des IStroms nicht negativ beeinflussen sollte. Hierfür wurden in P2 und P9.1-Loop jeweils eine NcoI-Schnittstelle als spätere Klonierungsstelle für das *catP*-Gen eingefügt. Durch die singuläre

Schnittstelle konnte das *catP* in sense und antisense Orientierung inkloniert werden. Die Untersuchung der Spleißaktivität der neu generierten Konstrukte sowohl die mit neu eingeführter NcoI-Schnittstelle in P2 und P9.1-Loop (Punktmutation) als auch die mit *catP* Gen in P.2 und P.9.1-Loop konnten als zweifelsfrei belegt werden. Sequenzierungen der klonierten RT-PCR Produkte bewiesen, dass es sich um reguläre Spleißprodukte handelte, die Untersuchung der Spleißkinetik zeigte eine mit dem nativen Typ-0-Konstrukt vergleichbare Kinetik, gleichbedeutend mit dem Nachweis, dass die eingeführte NcoI-Schnittstelle in P.2 oder P.9.1-Loop und das eingeführte *catP* in P2 oder P9.1-Loop keinen Einfluss auf die Spleißaktivität des IStrons ausübt. Mit dem Plasmid in Sense-Orientierung IStron(+) und Antisense-Orientierung IStron(-) in Bezug auf den T7-Promotor des pCR2.1 und den verschiedenen Typ-0-Konstrukten [IStron(+)-P2*catP*+, IStron(+)-P2*catP*-, IStron(-)-P2*catP*+, IStron(-)-*catP*-, IStron(+)-P9.1*catP*+, IStron(+)-P9.1*catP*-, IStron(-)-P9.1*catP*+, IStron(-)-P9.1*catP*-] waren damit die Konstrukte mit modifizierten IStrons generiert, auf die mit Hilfe des integrierten *catP*-Gens (in P2- und P9.1-Loop) jeweils in Sense- und Antisense-Orientierung selektioniert werden konnte.

Die Untersuchungen zur Mobilität des IStrons konnte nicht in *C. difficile* durchgeführt werden, da in allen bisher untersuchten *C. difficile*-Stämmen zumindest eine Kopie des IStrons gefunden worden war [185]. Die Wahl fiel auf den apathogenen Keim *Listeria innocua*, da er eine ähnliche Codon-Usage wie *C. difficile* besitzt, so dass angenommen werden konnte, dass die beiden IStron kodierten, potentielle Transposasen TlpA und TlpB in *L. innocua* exprimiert werden sollten. Ein weiterer Grund für die Wahl von *L. innocua* als Modell-Organismus lag darin, dass für diesen Keim mit dem Suizidplasmid pAUL-A, ein Derivat der pE194-Familie von Suizidplasmiden, mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (T-ori) verfügbar ist [233]. Dieser Vektor enthält sowohl Regulationssequenzen für gram(+)-Bakterien als auch für *E. coli* [233]. Bei Nutzung dieses Vektors konnten die Klonierungsschritte in *E. coli* durchgeführt werden, womit sich die genetischen Manipulationen wesentlich vereinfachen ließen. In *C. difficile* sind mehrere Kopien des IStron vorhanden, die über ein komplett erhaltenes *tlpB*-Gen verfügen. Dies gilt insbesondere für die Typen 0, I und II. Infolge der Mehrfachkopien ergibt sich die Problematik, dass Transpositionen aus cis- oder aus trans-Stellung induziert werden könnten. Frühere Studien zu anderen transposablen Elementen haben gezeigt, dass Transpositionen effizienter werden, wenn die Transposase durch das Element selbst

gebildet wird, oder wenn das Transposase-Gen in der Nähe oder gar auf dem gleichen DNA-Molekül vorliegt. Die Bevorzugung einer solchen cis-Aktivität reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass Transposase-Expression, ausgehend von einem beliebigen Element, die Aktivierung der Transposition einer Kopie an anderer Stelle im Genom induziert. Bei dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Modellsystem *L. innocua* entfällt eine solche Schwierigkeit. Es ist egal ob die Transposition aus cis- oder trans-Stellung abläuft, weil es in *L. innocua* nur die eine Art der IStrons und keine weiteren IStron-Varianten gibt. Damit sind die Typ-III-Varianten der generierten Konstrukte geeignete Negativkontrollen für die Transposaseaktivität.

Um die Voraussetzungen für die Transkription in *L. innocua* zu schaffen, musste ein für gram(+)-Bakterien geeigneter Promotor ausgewählt werden. Hierfür bot sich der p23-Promotor an, der in derselben Orientierung zum IStron-Konstrukt eingeführt wurde. Der p23-Promotor wurde aus dem Plasmid pLATO-Rep-p23, der einen p23-Promotor besitzt, mobilisiert und entsprechend über „Forced Cloning“ in die Varianten der Plasmide [IStron(+)-P2catP+, IStron(+)-P2catP-, IStron(-)-P2catP+, IStron(-)-catP-, IStron(+)-P9.1catP+, IStron(+)-P9.1catP-, IStron(-)-P9.1catP+, IStron(-)-P9.1catP-] ligiert (Abb. 4.13). Für alle Konstrukte mussten ferner geeignete Negativkontrollen generiert werden, die entweder nur eine der beiden Transposasen-Gene, *tlpA* und *tlpB*, oder keines dieser beiden Gene enthielten. Da die IStron-Typ-III-Variante mit Deletion $\Delta tlpB$ als spleißaktiv vorbeschrieben war, wurde diese Typ III-Variante als Negativ-Kontrolle für die potentiellen Transposase-Aktivitäten gewählt. Dazu wurden mit Hilfe einer megaprimer PCRs Deletionen in dem IS-Element Anteil des IStrons Typ 0 induziert, um aus den Konstrukten p23-IStron(+)-P2catP(+), p23-IStron(+)-P2catP-, p23-IStron(+)-P9.1catP+ und p23-IStron(+)-P9.1catP- analoge „Typ-III-Varianten“ zu erzeugen. Die so entstandenen IStron-Konstrukte wurden in den Suizidplasmid Plasmid pAUL-A ligiert. Das so entstandene Plasmid (pAUL-A + IStron-Konstrukt) wurde in *L. innocua* eingeführt. Die Funktionalität des p23-Promotors und die Expression des *catP*-Gens in *L. innocua* als Modelorganismus konnte belegt werden. Ferner wurde gezeigt, dass das Suizidplasmid pAUL-A in *L. innocua* funktionell war. Damit war ein Mobilitätsassay entwickelt, der es ermöglichte, die Mechanismen der Mobilität des chimären IStron zu Untersuchung und zu charakterisieren.

Als Perspektive für nachfolgende Arbeiten bietet sich ein direkter experimenteller Nachweis der Transposase-vermittelten Mobilität an. Damit könnte auch gezeigt

werden, dass weitere Mobilitätsfaktoren nicht notwendig sind. Mit dem hier etablierten Modell sind weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Mobilität des CdISt-1 möglich, um entscheidende Fragen zum Mechanismus aufzuklären, wie etwa die Häufigkeit des Springens des IStrons, oder auch der Ort der Integration des IStrons (ob es z.B. in einen ORFs springt, in ein Gen einer strukturellen RNA oder aber in nicht-kodierenden Regionen des Chromosoms). Hierfür sollten die in der vorliegenden Arbeit hergestellten rekombinanten Listerien, die das konstruierte Plasmid (pAUL-A + IStrom-Konstrukt) tragen, bei 42°C kultiviert werden, einer Temperatur die eine Replikation des Suizidplasmids nicht erlaubt. Übt man dann gleichzeitig mit Chloramphenicol einen Selektionsdruck aus, so sollten nur die Bakterienzellen überleben, bei denen das IStrom-catP-Konstrukt in das Chromosom gesprungen ist und von dort aus aktiv wird. Die Analyse der entsprechenden Integrationsstellen, es sollten transkriptionsaktive Loci sein, wird die Informationen über den Mobilitätsmechanismus des CdISt-1 wesentlich erweitern.

7 Literatur

1. C.L. Hataway: Toxygenic clostridia. *Clin. Microbiol.* 1990, Rev. 3, 66-98.
2. E.J. Kuijper, R.J. van den Berg, S. Debast et al.: Clostridium difficile ribotype 027, toxynotyplIII, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 827-30.
3. L. Kyne, M.B. Hamel, R. Polavaram, C.P. Kelly: Health care coats and mortality associated with nosocomial diarrhea due to Clostridium difficile. *Clin Infect Dis*, 2002; 34: 346-53.
4. S. Hafiz, C.L. Oakley: Clostridium difficile. Isolation and Characteristics. *J. Med. Microbiol.*, 1976, 9: 129-136.
5. J.S. Brazier: The epidemiologie and typing of Clostridium difficile. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl C: 47-57.
6. J. M. T. Finney: Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 1893, 53-55.
7. I.C. Hall and E. O'Tool: Interstinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficile. *Am J Dis Child*, 1935, 390-402.
8. J.G. Barlett, A. B. Onderdonk, R.L. Cisneros and D.L. Kasper: Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. *J InfectDis*, 1977, 136: 701-707.
9. H.E. Larson, J.V. Parry, A.B. Price, D.R. Davies, J. Dolby, D.A. Tyrrell: Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br Med J*, 1977, 1:1246-1248.
10. H.E. Larson and A. B. Price: Pseudomembranous colitis: Presence of clostridial toxin. *The Lancet*, 1977, 2: 1312-1314.
11. W.L. George, R. D. Rolfe, S.M. Finergold: Diarrhea and colitis associated with antimicrobial therapy in man and animals. *Am-J-Clin-Nutr.*, 1979, 32: 251-257
12. N.S. Taylor, G. M. Thorne, J.G. Barlett: Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile. *Infect Immun*, 1981, 34: 1036-1043.
13. B.M. Riedel: Über Darmdiphtherie nach schweren Operationen bei sehr geschwächten Kranken. *Dtsch. Ztschr. Chir.*, 1902, 67, 402
14. L. Reiner, M.L. Schlesinger, G. M. Miller: Pseudomembranous colitis following aureomycin and chloramphenicol. *Arch. Pathol.*, 1952, 39-67.
15. F.J. Tedesco, R. W. Barton, D. H. Alpers: Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med*, 1974, 81: 429-422.
16. H.E. Larson, A.B. Prince, P. Honour & S.P. Borriello: Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *The Lancet*, 1978; 1(8073): 1063-6.
17. W.L. George, V.L. Suttler, E.J. Goldstein, S.L. Ludwig, S.M. Finegold: Aetiologie of antimicrobial-agent-associated colitis. *The Lancet*, 1978; 1(8068): 802-3.
18. C.P. Kelly, C. Pothoulakis, J.T. LaMont: Clostridium difficile colitis. *N Engl J Med* 1994; 330(4): 257-62.
19. J.G. Barlett: Narrative Review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease. *Ann Intern Med*, 2006; 145: 758-64.

20. J. Cloud, C.P. Kelly: Update on Clostridium difficile-associated disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 4-9
21. L. Eggertson, B. Sibbald: Hospitals battling outbreaks of C. difficile. *CMAJ* 2004; 172(1): 19-21.
22. L. Eggertson: C. difficile strain 20 times more virulent. *CMAJ*, 2005; 172(10): 1279.
23. L. Valiquette, D. E. Low, J. Pepin, A. McGeer: Clostridium difficile infection in hospitals: a brewing storm. *CMAJ*, 2004; 171(1): 27-9.
24. V.G. Loo, M.D. Libman, M.A. Miller, A. Bourgault, C.H. Frenette, M. Kelly, S. Michaud, T. Nguyen, L Poirier, A. Vibien, R. Horn, P. J. Laflamme, P. Rene: Clostridium difficile: a formidable foe. *CMAJ*, 2004; 171(1): 47-8.
25. T.J. Louie, J. Meddings: Clostridium difficile infection in hospitals: risk factors and responses. *CMAJ*, 2004; 171(1): 45-6.
26. S. M. Poutanen, A. E. Simor: Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 2004; 171(1): 51-8.
27. L.V. McFarland, S. A. Brandmarker, S. Guandalini: Pediatric Clostridium difficile: a phantom menace or clinical reality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 31(3): 220-31
28. O. Schroder, R. Gerhard, J. Stein: Antibiotika-assoziierte Diarrhö. *Z Gastroenterol*, 2006; 44: 193-204.
29. M. Cerquetti, I. Luzzi, A. Caprioli, A. Sebastianelli, P. Mastrantonio: Role of Clostridium difficile in childhood diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*, 1995; 14(7): 598-603.
30. L.V. McFarland, M.B. Coyle, W. H. Kremer, W. E. Stamm: Rectal swab cultures for Clostridium difficile surveillance studies. *J Clin Microbiol*, 1987; 25 (11): 2241-2.
31. S. Toma, G. Lesiak, M. Magus, H.L. Lo, M. Delmee: Serotyping of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol*, 1988, 26: 426-428.
32. R. Eglow, C. Pothoulakis, S. Itzkowitz, E.J. Israel, C.J. O'Keane, D. Gong, N. Gao, Y.L. Xu, W.A. Walker, J.T. LaMont: Diminished Clostridium difficile toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest* 1992; 90(3): 822-9.
33. A.A. Salyers, D.D. Whitte: Pseudomembranous Colitis. In: Whitte DD (Hrsg): *Bacterial Pathogenesis*. Washington, D.C.: ASM Press, 1994: 282-289.
34. H. Kindon, C. Pothoulakis, L. Thim, K. Lynch-Devaney, D.K. Podolsky: Trefoil peptide protection of interstinepithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995; 109(2): 516-23.
35. M. Cooperstock, L. Riegle, C.W. Woodruff, A. Onderdonk: Influence of age, sex, and diet on asymptomatic colonization of infants with clostridium difficile. *J Clin Microbiol*, 1983; 17(5): 830-3.
36. K. Kim, L.K. Pickering, H.L. DuPont, N. Sullivan, T. Wilkins: In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of Clostridium difficile. *J Infect Dis* 1984; 150(1): 57-62.
37. D.M. Lyerly, H.C. Krivan, T.D. Wilkins: Clostridium difficile: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev*, 1988;1(1): 1-18.
38. K. Tullus, B. Aronsson, S. Marcus, R. Mollby: Interstinal colonization with Clostridium difficile in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1989; 8 (5): 390-3.

39. L.V. McFarland, W.E. Stamm: Review of Clostridium difficile-associated diseases. *Am J Infect Control* 1986; 14(3): 99-109.
40. L.C. McDonald, G.E. Killgore, A. Thomson et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med*, 2005; 353: 2433-41.
41. L.V. McFarland, M.E. Mulligan, R.Y. Kwok, W.E. Stamm: Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. *N Engl J Med*, 1989; 320: 204-10.
42. S.P. Borriello: Pathogenesis of Clostridium difficile infection. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl C: 13-9.
43. J.S. Brazier, S.P. Borriello: Microbiology, epidemiology and diagnosis of Clostridium difficile infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2000. 2501-33.
44. M.W. Hull, P.L. Beck: Clostridium difficile-associated colitis. *Can. Fam-Physician*. 2004. 501536-5.
45. R. Fekety: Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*, 1997; 92: 739-50.
46. J.G. Bartlett: Clinical Practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J Med.*, 2002. 346-339.
47. S.M. Poutanen, A.E. Simor; Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 2004. 171(1): 51-58.
48. L.V. McFarland, C.M. Surawicz, M. Rubin, R. Fekety, G.W. Elmer, R.N. Greenberg; Recurrent clostridium difficile disease: epidemiology and clinical characteristics. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1999. 20(1): 43-50.
49. E. Mylonakis, E.T. Ryan, S.B. Calderwood: Clostridium difficile-associated diarrhea: A review. *Arch. Intern. Med.*, 2001. 161(4): 525-533.
50. C.M. Surawicz: Treatment of recurrent Clostridium difficile-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol*, 2004; 1: 32-8.
51. L.V. McFarland, C.M. Surawicz, R.N. Greenberg et al.: A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease. *JAMA*. 1994. 271(24): 1913-1918.
52. I. Castagliuolo, M.F. Riegler, L.J.T. Valenick, C. Pothoulakis: Saccharomyces boulardii protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxin A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun.*, 1999. 67(1): 302-307.
53. L.C. McDonald, M. Owings, D.B. Jerniger: Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 409-15.
54. Center For Disease control and Prevention (CDC): Severe Clostridium difficile-associated disease in populations previously at low risk - four states. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54: 1201-5.
55. E.J. Kuijper, B. Coignard, P. Tull: The ESCMID Study Group for Clostridium difficile in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2006; 12 (Suppl 6): 2-18.
56. C. von Eichel-Streiber, P. Boquet, M. Sauerborn, M. Thelestam: Large clostridial cytotoxins – A family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol*, 1996. 4(10): 375-82

57. K. Amimoto, T. Noro, E. Oishi, M. Shimizu: A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology*, 2007. 153(Pt 4): 1198-1206
58. C. von Eichel-Streiber, M. Sauerborn, H. Kuramitsu: Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glycosyltransferases. *J Bacteriol.*, 1992, 174, 6707-6710
59. S.H. Cohen, Y.J. Tang, J.J. Silva: Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis*, 2000; 181(2): 659-63.
60. M. Sebaihia, B.W. Wren, P. Mullany et al.: The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet*, 2006; 38: 779-86.
61. V. Braun, T. Hundsberger, P. Leukel, M. Sauerborn, C. von Eichel-Streiber: Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*, 1996; 181(1-2):29-38.
62. T. Hundsberger, V. Braun, M. Weidemann, P. Leukel, M. Sauerborn, C. von Eichel-Streiber: Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem*, 1997. 244:735-742
63. N. Mani, B. Dupuy: Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci.*, 2001, USA 1998.Nr. 10,5844-5849
64. S. Kamiya, H. Ogrura, X.Q. Mang, S. Nakamura: Correlation between cytotoxin and sporulation in *Clostridium difficile*. *J Med. Microbiol*, 1992: 37:206-210.
65. C. von Eichel-Streiber, R. Laufenberg-Feldmann, S. Sartingen, J. Schulze, M. Sauerborn: Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* 1992. 233(1-2):260-268
66. S.M. Frey, T.D. Wilkins: Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A. *Infect. Immun.*, 1992. 60(6): 2488-2492
67. F. Hofmann, A. Herrmann, E. Habermann, C. von Eichel-Streiber: Sequencing and analysis of the gene encoding the alpha-toxin of *Clostridium novyi* proves its homology to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, 247 (6):670-679
68. G. Pfeifer, J. Schirmer, C. Busch, D.K. Meyer, K. Aktories, H. Barth: Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, 2003.278(45): 44535-44541
69. J. Schirmer, K. Aktories: Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glycosylating toxins. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2004. 1673(1-2):66-74
70. J. Selzer et al.: *Clostridium novyi* alpha-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): 25173-7
71. M. Moos, C. von Eichel-Streiber: Purification and evaluation of large clostridial cytotoxin that inhibit small GTPases of Rho and Ras subfamilies. *Methods Enzymol*, 2000. 325: 114-25
72. I. Just et al.: Glycosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 1995. 375(6531): 500-3
73. M. R. Popoff et al.: Ras, Rap and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glycosylation. *J Biol Chem*, 1996. 271(17): 10217-24

74. P. Chardin et al.: The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *Embo J*, 1989. 8(4): 1087-92
75. H.F. Paterson et al.: Microinfection of recombinant p21rho induces rapide changes in cell morphology. *J Cell Biol*, 1990. 111(3): 1001-7
76. M. Giry et al.: Transient expression of RhoA-, B-, and C- GTPases in HeLa cells potentiates resistance to Clostridium difficile toxin A und B but not to Clostridium sordellii lethal toxin. *Infect Immun*, 1995. 63(10): 4063-71.
77. E. Chaves-Olarte et al.: Toxin A and B from Clostridium difficile differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *J Clin Invest*, 1997. 100(7): 1734-41
78. E. Chaves-Olarte et al.: A novel cytotoxin from Clostridium difficile serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem*, 1999. 274(16): 11046-52
79. S.T. Donta, N. Sullivan, T.D. Wilkins: Differential effects of Clostridium difficile toxins on tissue-cultured cells. *J Clin Microbiol*, 1982.15(6): 1157-8
80. F. Hofmann et al.: Sequencing and analysis of the gene encoding the alpha-toxin of Clostridium novyi proves its homology to toxins A and B of Clostridium difficile. *Mol Gen Genet*, 1995. 247(6): 670-9
81. A. Oksche, R. Nakov, E. Habermann: Morphological and biochemical studys of cytoskeletal changes in cultured cells after extracellular application of Clostridium novyi alpha-toxin. *Infect Immun*, 1992. 60(7): 3002-6
82. R.D. Martinez, T.D. Wilkins: Purification and characterization of Clostridium sordellii hemorrhagic toxin and cross-reactivity with Clostridium difficile toxin A (enterotoxin) . *Infect Immun*, 1988, 58(5): 1215-21
83. M.R. Popoff: Purification and characterisation of Clostridium sordellii lethal toxin and cross-reactivity with Clostridium difficile cytotoxin. *Infect Immun*, 1987. 55(1):35-43
84. J.F. Torres: Purification and characterisation of toxin B from a strain of Clostridium difficile that does not produce toxin A. *J Med Microbiol*, 1991 .35(1):40-4
85. C. von Eichel-Streiber et al.: Closing in on the toxic domain through analysis of a variant Clostridium difficile cytotoxin B. *Mol Microbiol*, 1995. 17(2): 313-21
86. C. von Eichel-Streiber et al.: Morphological changes in adherent cells induced by Clostridium difficile toxins. *Biochem Soc Trans*, 1991. 19(4): 1154-60
87. R.A. Badley et al.: Cytoskeletonchanges in fibroblastadhesion and detachment. *J CellSci*, 1980, 43: 379-90
88. M. Mehling, M. Moos, V. Braun, B. Kalt, D.E. Mahony, C. von Eichel-Streiber: Variant toxin B and a functional toxin A produced by Clostridium difficile C34. 2001, *FEMS Microbiol Letters* 198: 171-176
89. K.S. Tan, B.Y. Wee, K. P. Song: Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of Clostridium difficile. 2001. *J Med Microbiol*50, 613-19
90. Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.*, 2001, 81, 153-208.
91. S. Etienne-Manneville, A. Hall: Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420, 629-635.
92. P. Sehr et al.: Glucosylation and ADP ribosylation of Rho proteins: effects on nucleotidebinding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 37, 5296–5304 (1998).

93. P.O. Falnes, K. Sandvig: Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2000, 12, 407-413.
94. D.M. Gill, R. Meren: ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jul;75(7):3050-4.
95. Ménétrey et al.: Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon.* 2005 Feb; 45 (2): 129-37. Review.
96. K.D. Tucker, T.D. Wilkins: Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* 59, 73–78 (1991).
97. K.A. Karlsson: Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 622–635 (1995).
98. D.M. Lyerly, H.C. Krivan, T.D. Wilkins: *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 1–18 (1988).
99. H. Barth et al.: Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10670–10676 (2001).
100. M. Qa'Dan, L.M. Spyres, J.D. Ballard: pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. *Infect. Immun.* 68, 2470–2474 (2000).
101. H. Barth et al.: Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10670–10676 (2001).
102. G. Pfeifer et al.: Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 278, 44535–44541 (2003).
103. M. Rupnik et al.: Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology* 151, 199–208 (2005).
104. J. Reineke, S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schratzenholz, H. Schild, C. von Eichel-Streiber: Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature.* 2007 Mar 22; 446 (7134): 415-9. Epub 2007 Mar 4.
105. C. von Eichel-Streiber et al.: Large clostridial cytotoxins - a family of glycosyl transferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol.* 1996. 4(10): p. 375-82.
106. P. Starlinger, H. Saedler: Insertion mutations in microorganisms. *Biochemie*, 1972.54(2): p. 177-85
107. B. McClintock: Further studies of the Suppressor-mutator system of control of gene action in maize. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, 1961, 60: 469-476
108. A. McGregor: Transposon and Transposome Mutagenesis of Plasmids, Cosmids and BACs. *Methods in Mol Biol.* 2003; 235-233-46
109. P.M. Bennette: Transposable elements. *Encyclopaedia of Microbiology*, Second edition, 2000, Vol.4 Ed. J. Lederberg, Pp704-724. Publ. Academic Press, San Diego
110. P.M. Bennette, J. Grinstead (eds): Detection and use of transposons (2nd edition), 205 pp: Vol. 21 *Methods in Microbiology*, 1988, published by Academic Press.
111. R. Bishop, D. Sherratt: Transposon Tn1 intramolecular transposition. *Mol Gen Genet.*, 1984, 196: 117-122

112. J. Grinstead, F. De La Cruz, R. Schmitt: The Tn21 subgroup of bacterial transposonable element. *Plasmid*, 1990, 24: 163-189
113. C.A. Liebert, R.M. Hall, A.O. Summers: Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome Microb. *Molec Biol Rev*, Sept. 1999; p. 507-522
114. F.R.J. Schmidt, E.J. Nücken, R.B. Henschke: Structure and function of hot spots providing signals for site-directed specific recombination and gene expression in Tn21 transposons. *Mol. Microbiol.*, 1989, 3: 1545-1555
115. R. Schmitt: Molecular biology of transposable elements. *Jur. Of Antimic. Chemotherapy*, 1986, 18:25-34
116. P.T. Barth et al.: Transposition of a desoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R483 to other replicons. *J Bacteriol*, 1976. 125(3): p.800-10
117. C. Dahlberg, C. Hermansson: Abundance of Tn3, Tn21 and Tn501 Transposase (tnpA) Sequences in Bacterial Community DNA from Marine Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, p. 3051-3056
118. P. Starlinger, H. Saedler: IS-Elements in microorganisms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1976, 75: 111-152
119. P. Nevers, H. Saedler: Mapping and characterization of an *E. coli* mutant defective in IS1-mediated deletion formation. *Mol. Gen. Genet.*, 1978, 160: 209-214.
120. W. Arber, S. Iida, H. Jutte, P. Caspers, J. Meyer, C. Hanni: Rearrangements of genetic material in *Escherichia coli* as observed on the bacteriophage P1 plasmid. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1980, 43: 1197-1208.
121. D. J. Galas, M. Chandler: Structure and stability of Tn9-mediated cointegrates. evidence for two pathways of transposition. *J. Mol. Biol.*, 1982, 154: 245-272.
122. N. Davidson, R.C. Deonier, S. Hu, E. Ohtsubo: Electron microscopic heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. X. Deoxyribonucleic acid sequence organization of F and of F-primes, and the sequences involved in Hfr formation. In: *Microbiology-1974*, 56-65, Schlessinger D.(ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
123. H. Ohtsubo, E. Ohtsubo: Nucleotide sequence of an insertion element, IS1. *Proc. Acad. Sci.*, 1978, USA 75:615-619.
124. S.N. Cohen: Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, 1976, 263: 731-738
125. M. Syvanen: The evolutionary implications of mobile genetic elements. *Ann. Rev. Genet.*, 1984, 18: 271-293.
126. C. Rensing, D.T. Newby, I.L. Pepper: The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil. Biol. Biochem.*, 2002, 34:285-296
127. L. Haren, B. Ton-Hoang, M. Chandler: "Integrating DNA: transposases and retroviral integrases." *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 245-81.
128. H.S. Malik, T.H. Eickbush: Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res.* 11, 1187-1197 (2001).
129. P.L. Deininger, M.A. Batzer: Mammalian retroelements. *Genome Res* 12, 1455-65 (2002).

130. J. Mahillon, C. Leonard, M. Chandler: "IS elements as constituents of bacterial genomes." *Res Microbiol*, 1999, 150(9-10): 675-87. – 144
131. C. Turlan, M. Chandler: "Playing second fiddle: second-strand processing and liberation of transposable elements from donor DNA." *Trends in Microbiology*, 2000, 8(6): 268-274.
132. J. Mahillon and M. Chandler: Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 725-74.
133. N.L. Craig: "Transposon Tn7." *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 204: 27-48.
134. N. Kleckner, R. M. Chalmers, D. Kwon, J. Sakai, S. Bolland: Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation in vivo and in vitro. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 204: 49-82.
135. P. Polard, B. Ton-Hoang, L. Haren, M. Betermier, R. Walczak, M. Chandler : "IS911-mediated transpositional recombination in vitro." *J Mol Biol*, 1996, 264(1): 68-81.
136. A. K. Kennedy, A. Guhathakurta, N. Kleckner, D. B. Haniford: "Tn10 transposition via a DNA hairpin intermediate." *Cell*, 1998, 95(1): 125-34
137. A. Bhasin, I. Y. Goryshin, W. S. Reznikoff: "Hairpin formation in Tn5 transposition." *J Biol Chem*, 1999, 274(52): 37021-9.
138. P. Polard, M. Chandler: "An in vivo transposase-catalyzed single-stranded DNA circularization reaction." *Genes Dev*, 1995, 9(22): 2846-58.
139. B. Ton-Hoang, M. Betermier, P. Polard, M. Chandler: "Assembly of a strong promoter following IS911 circularization and the role of circles in transposition." *Embo J*, 1997, 16(11): 3357-71.
140. B. Ton-Hoang, P. Polard, M. Chandler: "Efficient transposition of IS911 circles in vitro." *Embo J*, 1998, 17(4): 1169-81.
141. B. Ton-Hoang, P. Polard, L. Haren, C. Turlan, M. Chandler: "IS911 transposon circles give rise to linear forms that can undergo integration in vitro." *Mol Microbiol*, 1999, 32(3): 617-27.
142. I. Loessner, K. Dietrich, D. Dittrich, J. Hacker, W. Ziebuhr: "Transposase- Dependent Formation of Circular IS256 Derivatives in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus." *J. Bacteriol.*, 2002, 184(17): 4709-4714.
143. M. Prudhomme, C. Turlan, J. P. Claverys, M. Chandler: "Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles." *J Bacteriol*, 2002, 184(2): 433-43.
144. G. Duval-Valentin, B. Marty-Cointin, M. Chandler: "Requirement of IS911 replication before integration defines a new bacterial transposition pathway." *Embo J*, 2004, 23(19): 3897-906.
145. J. Kulkosky, K.S. Jones, R. A. Katz, J.P. Mack, A.M. Skalka: Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(5): 2331-8.
146. J.S. Allingham, P. A. Pribil, D. B. Haniford: "All three residues of the Tn 10 transposase DDE catalytic triad function in divalent metal ion binding." *J Mol Biol* 289, 1999, (5):1195-206.
147. N.P. Tavakoli, J. Devost, K.M. Derbyshire: Defining Functional Regions Of the Is903 Transposase. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274(4): 491-504.
148. L. Haren, P. Polard, B. Ton Hoang, M. Chandler: "Multiple oligomerization domains in the IS911 transposase: A leucine zipper motif is essential for activity." *Journal of MolecularBiology*, 1998, 283(1): 29-41.

149. W.S. Reznikoff: The Tn5 transposon. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 945-63.
150. T. Forne, E. Labourier, E. Antoine, F. Rossi, I. Gallouzi, G. Cathala, J. Tazi, C. Brunel: Structural features of U6 snRNA and dynamic interactions with other spliceosomal components leading to pre-mRNA splicing. *Biochemie*, 1996, 78:436-442
151. C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman: "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." *Cell*, 1983, 35(3):849-57.
152. W.Y. Tarn, J.A. Steiz: Pre-mRNA splicing: The discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends in Biochem, 1997, Sci.* 22:132-137
153. K. Kruger et al.: Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 1982. 31(1): p. 147-57.
154. A.M. Lambowitz, P.S. Perlmann: Involvement of aminoacyl-tRNA synthetases and other proteins in group I and group II intron splicing. *Trends Biochem. Sci.*, 1990, 15:440-444
155. J.M. Burke: Molecular genetics of group I introns: RNA structures and protein factors required for splicing – a review. *Gene*, 1988, 73:273-294
156. M. Belfort, P.S. Perlman: Mechanisms of intron mobility. *J Biol Chem*, 1995: 270(51): p. 30237-40.
157. A.M. Lambowitz, M. Belfort: Introns as mobile genetic elements. *Annu Rev Biochem*, 1993. 62: p. 587-622.
158. R. Saldanha *et al.*: Group I and group II introns. *Faseb J*, 1993. 7(1): p. 15-24.
159. T.R. Cech: Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem*, 1990. 59: p. 543-68.
160. H.A. James, P.C. Turner: Ribozymes. *Methods Mol Biol*, 1997. 74: p. 1-9.
161. Lambowitz, A.M., Infectious introns. *Cell*, 1989. 56(3): p. 323-6.
162. M. Belfort, R.J. Roberts: Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(17): p. 3379-88.
163. L. Jaeger, F. Michel, E. Westhoff: The structure of group I ribozymes, in *Catalytic RNA*, F. Eckstein and M.J. Lilley, Editors. 1997, *Springer-Verlag*: Berlin-Heidelberg. p. 33-51.
164. F. Michel, E. Westhof: Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, 1990. 216(3): p. 585-610.
165. E.T. Barford, T.R. Cech: The conserved U.G pair in the 5' splice site duplex of a group I Intron is required in the first but not in second step of self-splicing. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, 9:3657-3666
166. E.R. Suh, R.B. Waring: Base pairing between the 3' exon and an internal guide sequence increases 3' splice site specificity in *Tetrahymena* self-splicing ribosomal rRNA intron. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10:2960-2965
167. S.L. Brehm, T.R. Cech: Fate of an intervening sequence ribonucleic acid: Excision and cyclization of *Tetrahymena* ribosomal ribonucleic acid intervening sequence *in vivo*. *Biochemistry*, 1983, 22:2390-2397
168. F. Zhang, E.S. Ramsay, S.A. Woodson: *In vitro* facilitation of *Tetrahymena* group I intron splicing in *Escherichia coli* pre-ribosomal RNA. *RNA*, 1995, 1:284-292
169. Coetzee et al.: *Escherichia coli* proteins, including ribosomal protein S12, facilitate *in vitro* splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes Dev.*, 1994, 8:1575-1588
170. J. A Douna, T. R. Cech: The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*, 2000, 418(6894): 222-228

171. W. Y. Warashina, W. Takagi, J. Stec and K. Taira: "Differences among mechanisms of ribozyme-catalyzed reactions." *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(4):354-362.
172. S. H. Damberger and R. R. Gutell: A comparative database of group I intron structures. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(17): p. 3508-10
173. M. G. Kuhsel, R. Strickland, J. D. Palmer: An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science*, 1990, 250(4987): p. 1570-3.
174. B. Reinhold-Hurek, D. A. Shub: Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria. *Nature*, 1992, 357 (6374): p. 173-6.
175. M.Q. Xu et al.: Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. *Science*, 1990. 250(4987): p. 1566-70.
176. D. Biniszkiwicz, E. Cesnaviciene, D. A. Shub: Self-splicing group I intron in cyanobacterial initiator methionine tRNA: evidence for lateral transfer of introns in bacteria. *Embo J*, 1994. 13(19): p. 4629-35.
177. B. Paquin et al.: Origin and evolution of group I introns in cyanobacterial tRNA genes. *J Bacteriol*, 1997. 179(21): p. 6798-806.
178. D.H. Bechhofer, K.K. Hue, D.A. Shub: An intron in the thymidylate synthase gene of *Bacillus bacteriophage beta 22*: evidence for independent evolution of a gene, its group I intron, and the intron open reading frame. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(24): p. 11669-73
179. H. Goodrich-Blair, D.A. Shub: The DNA polymerase genes of several HMU bacteriophages have similar group I introns with highly divergent open reading frames. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(18): p. 3715-21.
180. P. Young et al.: Intron-containing T4 bacteriophage gene sunY encodes an anaerobic ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*, 1994. 269(32): p. 20229-32.
181. M. Mikkonen, T. Alatosava: A group I intron in the terminase gene of *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Microbiology*, 1995. 141(Pt 9): p. 2183-90.
182. D. van Sinderen et al.: Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol Microbiol*, 1996. 19(6): p. 1343-55.
183. M. Landthaler, D.A. Shub, Unexpected abundance of self-splicing introns in the genome of bacteriophage Twort: introns in multiple genes, a single gene with three introns, and exon skipping by group I ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(12): p. 7005-10.
184. V. Lazarevic et al.: Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(4): p. 1692-7.
185. V. Braun, M. Mehlig, M. Moos, M. Rupnik, B. Kalt, D.E. Mahony, C. von Eichel-Streiber: A chimeric ribozyme in *Clostridium difficile* combines features of group I introns and insertion elements. *Mol Microbiol*, 2000, 36, 1447-59.
186. M. Ko, C. Hyang, C. Park: Group I self-splicing intron in the recA gene of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.*, 2002, 184 (14):3917-22.
187. P. Mullany et al.: Genetic analysis of a tetracycline resistance element from *Clostridium difficile* and its conjugal transfer to and from *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(Pt 7): p. 1343-9.

188. P. Mullany, M. Wilks, S. Tabaqchali: Transfer of macrolide-lincosamide-streptogramin B(MLS) resistance in *Clostridium difficile* is linked to a gene homologous with toxin A and is mediated by a conjugative transposon, Tn5398. *J Antimicrob Chemother*, 1995. 35(2): p. 305-15.
189. P. Mullany *et al.*: A group II intron in a conjugative transposon from the gram-positive bacterium, *Clostridium difficile*. *Gene*, 1996. 174(1): p. 145-50.
190. D. Lyras *et al.*: Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*, *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(7): p. 1563-7.
191. A.P. Roberts *et al.*: Demonstration that the group II intron from the Clostridial Conjugative transposon Tn5397 undergoes splicing *In vivo*. *J Bacteriol*, 2001. 183(4): p. 1296-9.
192. M. Rupnik, B Dupuy, N.F. Fairweather, D.N. Gerding, S. Johnson, I. Just, D.M. Lyerly, M.R. Popoff, J.I. Rood, A.L. Sonenshein, M. Thelestam, B.W. Wren, T.D. Wilkins, C. von Eichel-Streiber: Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *J Med Microbiol*. 2005 Feb; 54 (Pt 2): 113-7.
193. M.D. Been, T.R. Cech: Sites of circularization of the Tetrahymena rRNA IVS are determined by sequence and influenced by position and secondary structure. *Nucleic Acids Res*, 1985. 13(23): p. 8389-408.
194. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
195. P. Polard, M. Chandler: Bacterial transposases and retroviral integrases. *Mol Microbiol*, 1995. 15(1): p. 13-23.
196. Hasselmayer *et al.* 2004: *Clostridium difficile* IStron CdlSt1: Discovery of a Variant Encoding Two Complete Transposase-Like Proteins. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, No. 8, p.2508-2510
197. D. Kersulyte, N. S. Akopyants, S. W. Clifton, B. A. Roe, D. E. Berg: Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. *Gene*, 1998, 223:175-186.
198. S. Lam, J.R. Roth: Genetic mapping of IS200 copies in *Salmonella typhimurim* strain LT2. *Genetics*, 1983, 105:801-811
199. I. Gibert, J. Barbe, J. Casades: Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J Gen. Microbiol.*, 1990, 136:2555-2560.
200. S. Brynstad, L.A. Iwanejko, G.S. Stewart, P.E. Granum: A complex array of Hpr consensus DNA recognition sequences proximal to the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens* type A. *Microbiology*, 1994, 140:97-104.
201. C.R. Beuzon, J. Casades: Conserved structure of IS200 elements in *Salmonella*. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25:1355-1361.
202. A.P. Burnens, J. Stanley, R. Sack, P. Hunziker, I. Brodard, J. Nicolet: The flagellin N-methylase gene *fliB* and an adjacent serovar-specific IS200 element in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 1997, 143:1539-1547.
203. J.F. Tomb, O. White, A.R. Kerlavage, R.A. Clayton, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, H.P. Klenk, S. Gill, B.A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E.F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L.M.

- Fitzgerald, N. Lee, M.D. Adams, J.C. Venter: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1997, 388:539-547.
204. T.L. Stanley, C.D. Ellermeier, J.M. Slauch: Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage gfsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches. *J. Bacteriol*, 2002, 182:4406-4413.
 205. Y.J. Debets-Ossenkopp, R.G. Pot, D.J. van Westerloo, A. Goodwin, C.M. Vandenbroucke-Grauls, D.E. Berg, P.S. Hoffman, J.G. Kusters: Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (rdxA) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Antimicrob.AgentsChemother* 1999, 43 :2657-2662.
 206. D. Kersulyte, P. Mukhopadhyay, M. Shirai, D.E. Berg: Functional organization and insertion specificity of IS607, a chimaeric element of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol*, 2000
 207. Gordon, S.V., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrell, and S.T. Cole: New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 1999, 145:881-892.
 208. Kersulyte et al.: Transposable element ISHp608 of *Helicobacter pylori*: nonrandom geographic distribution, functional organization, and insertion specificity, *J. Bacteriol*, 2002, 184 (2002), pp. 992–1002.
 209. Ton-Hoang et al.: Transposition of ISHp608, member of an unusual family of bacterial insertion sequences, *EMBO J.24* (2005), pp. 3325–3338.
 210. Ronning et al.: Active site sharing and subterminal hairpin recognition in a new class of DNA transposases, *Mol. Cell*20 (2005), pp. 143–154.
 211. Guynet et al.: Single-stranded transposition of IS608: In vitro reconstitution of a new transposition mechanism, *Mol. Cell* (2008) in press.
 212. Zahradka et al.: Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus Radiodurans*, *Nature* 443 (2006), pp. 569–573.
 213. Menecier et al.: Mutagenesis via IS transposition in *Deinococcusradiodurans*, *Mol. Microbiol.*59 (2006), pp. 317–325.
 214. H.F. Noller, Reading the ribosome, *Science*309 (2005), pp. 1508–1514.
 215. Belfort et al.: Mobile introns: Pathways and proteins in mobile DNA II. In: *D.N.A. Mobile II*, N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert and A.M. Lambowitz, Editors, ASM Press, Washington, D.C. (2002), pp. 761–783.
 216. A.M. Lambowitz, S. Zimmerly: Mobile Group II Introns, *Annu. Rev. Genet.*38 (2004), pp. 1–35.
 217. Barabas et al.: Mechanism of IS200/IS605 Family DNA Transposases: Activation and Transposon Target Site Selection. *Cell* 132 (2008), 208-220
 218. S.M. Quirk, D. Bell-Pederson, M. Belfort: The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature*, 1998, 394:671-674
 219. C.H. Sellem, L. Belcour: Intron open reading frames as mobile elements and evolution of a group I intron. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, 14:518-526
 220. N. Loizos, E.R.M. Tillier, M. Belfort: Evolution of mobile group I introns: Recognition of intron sequences by an intron-encoded endonuclease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1994, USA 91:11983-11987

221. D. Bell-Pedersen, S. Quirke, J. Clyman, M. Belfort: Intron mobility in phage T4 is dependent upon a distinctive class of endonucleases and independent of DNA sequences encoding the intron core mechanistic and evolutionary implication. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18:3763-3770
222. Mueller et al.: Intron mobility in phage T4 occurs in the context of recombination-dependent DNA replication by way of multiple pathways. *Genes Dev.*, 1996, 10:351-364
223. Mueller et al.: Exon coconversion biases ying intron homing: Battle of the nucleases. *Genes Dev.*, 1996, 10:2158-2166
224. Vaughan et al.: Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *coxI* gene of peperomia. *J. Mol. Evol.*, 1995, 41:563-572
225. A.J. Thompson, D.L. Herrin: A chloroplast group I intron undergoes the first step of reverse splicing into host cytoplasmatic 5 cnddot 8S rRNA: Implication for intron-mediated RNA recombination, intron transposition and 5 cnddot 8S rRNA structure. *J. Mol. Biol.*, 1994, 236:455-468
226. Roman et al.: Integration of Tetrahymena group I intron into Bacterial rRNA by reverse splicing in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998, USA 95:2134-2139
227. Roman et al.: Sequence specificity of in vivo reverse splicing of the Tetrahymena group I intron. *RNA*, 1999, 5:1-13
228. S.A. Woodson, T.R. Cech: Reverse Self-splicing of group I intron: Implication for the directionality of splicing and for intron transposition. *Cell*, 1989, 57:335-345
229. L.A. Grivell: Intron mobility. Invasive introns. *Curr. Biol*, 1994. 4(2): p. 161-4.
230. M. Belfort, R.J. Roberts: Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(17): p. 3379-88.
231. D.R. Edgell, N.M. Fast, W.F. Doolittle: Selfish DNA: the best defense is a good offense. *Curr Biol*, 1996. 6(4): p. 385-8.
232. J. Mahillon, M. Chandler: Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62:725-774.
233. S. Schäferkordt, T. Chakraborty: Vector plasmid for insertional mutagenesis and directional cloning in *Listeria spp.* *BioTechniques*, 1995, 19, 720-725
234. M. Belfort: Self-splicing introns in prokaryotes: Migrant fossils? *Cell*, 1991, 64:9-11
235. W.F. Doolittle: Genes in pieces: were they ever together? *Nature*, 1978. 272(5645): p. 581-582.
236. W. Gilbert: Why genes in pieces? *Nature*, 1978. 271(5645): p. 501.
237. D.H. Hall, Y. Liu, D.A. Shub: Exon shuffling by recombination between self-splicing introns of bacteriophage T4, *Nature*, 1989. 340(6234): p. 575-6.
238. Belfort et al.: RNA splicing and *in vivo* expression of the intron containing *td* gene of bacteriophage T4. *Gene*, 1986, 41:93-102
239. Bhattacharya et al: Group I intron are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Chlorophyceae). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, USA 91:9916-9920
240. L. Gielly, P. Taberlet: The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, 11:769-777
241. D.S. Hibbett: Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.*, 1996, 13:903-917

242. Nishida et al: Group I intron found in *Chlorella viruses*: Biological implications. *Virology*, 1998, 242:319-326
243. Sogin et al.: Phylogenetics evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO*, 1986, 5:3625-3630
244. D.A. Shub: The antiquity of group I introns, *Curr Opin Genet Dev*, 1991. 1(4): p. 478-84.
245. R. Kersanach et al.: Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature*, 1994. 367(6461): p. 387-9.
246. W. Gilbert, S.J. de Souza, M. Long: Origin of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997.94(15): p. 7698-703.
247. A. Rzhetsky et al.: Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase genes supports the "introns-late" theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(13): p. 6820-5.
248. J.D. Palmer, J.M. Logsdon Jr.: The recent origins of introns. *Curr Opin Genet Dev*, 1991.1(4): p. 470-7.
249. A. Stoltzfus et al.: Intron "sliding" and the diversity of intron positions. *Proc Natl Acad Sci US A*, 1997. 94(20): p. 10739-44.
250. S.J. de Souza et al.: Toward a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(9): p. 5094-9.
251. M. Rupnik et al.: Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology*, 2001. 147(Pt 2): p. 439-47.
252. W.J. Dower, J.F. Miller, C.W. Ragsdale: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(13): p. 6127-45.

Anhang A: Primer

Primer	Sequenz (5'-3')
catP3	GCCCCCATGGCAGTTTTTCTTTTCGGCAAG
catP4	GCCCCCATGGTTTTAGTTACAGACAAACCTG
TransCheck1	CCTAAACTTGGTATGGTTAAG
TransCheck2	CCCACATTTATTGCATATTTG
PseudoSyn1	CTTCAAATTTAGGTTATGG
PseudoSyn2	AACCTTCCAACAGGAAATGG
Mobilität-MP2-5'	ATTACTATGTTAATATTATGCTAGTAAATATATTTAAAAGAAGGATTAAG
Mobilität-MP1-3'	CTTAATCCTTCTTTTAATATATTTATACTAGCATAATATTAACATAGTAAT
Mobilität-MP2-BamHI	GGGGATCCACTAGTAACGG
Sallp23	AGCTAGCTAGCTGTGCGACTCGAAAAGCCCTGACAACC
P23XbaI	AGCTAGCTAGCTTCTAGATATATTTGGCCTCCCTTTTTAA
ICheck1	CTGTGGTATGATAGTGAAGC
ICheck2	CGGAGCTTACCTGCTGATTG
ICheck3	CGGGGTGGCCTGTGGAGAA
ICheck4	ATCTATTGTAGGTAAGTGTAGG
ICheck5	CGAAATAACTAGGATTCCAAAGA
ICheck6	GTAACCTCCATTTTTTCATCACCTA
ICheck8	ATTTGTCAGGTTCCCTTAAGCCA
P1	CGACAACCTCAAAAATGATAAA
P2	TCTTAATCCTTCTTTTAATATATTT
P3	CGGAGCTTACCTGCTGATTG
P4	GCCCCTACCGGACACCTCTT

Anhang B: Nukleotidsequenzen

Nukleotidsequenz von CdlST1a-SE918

Acc. No. AJ579718

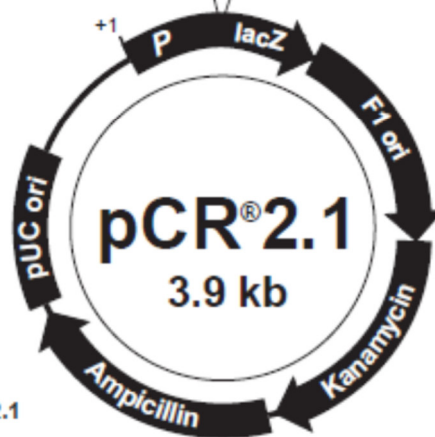
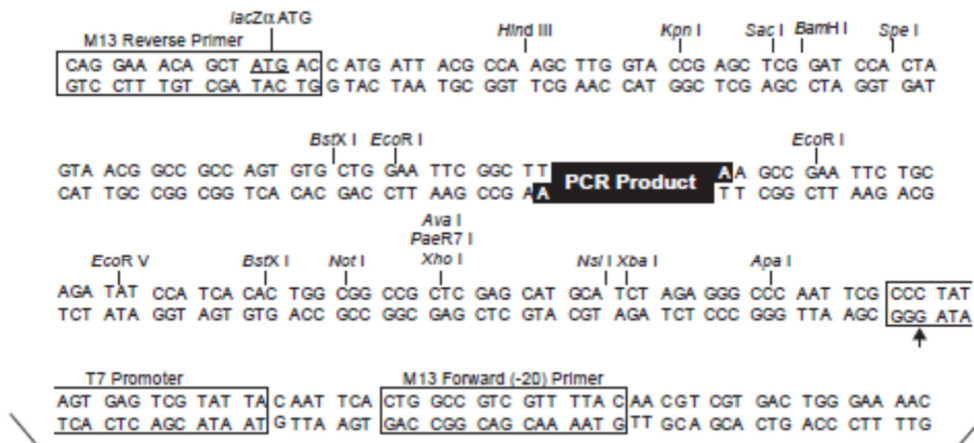
TAAAAAATAGCTACGTACACTCGTGACTTTAGTCATGAGTTAGTAGCTAAAATAGTCAGCAT
ATAGGGAAACYTATATGTAGAGATAGGATAGAGCCTATCCAATACTACTTGAATTGCTGGA
AACCCCTAAAGCTAACCAAACCTAAAACATAAGGATGAAATAAACCTAAGTGTGAAAGTTAC
GAAAGTAGAAAAAATTGGTTAGATGGTATAAGGTTAAACCCTAAGTACTTTAAAATGGGCA
ATCAGCAGGTAAACTCCGAATAGGAGAACTTCAACGACTATTCCTCTTGAGGGGAAGTACA
CTACAAGTTATCGGTAGTGGAAAGTGGGTAGACCTTAACGGATAATGCCGAAGGATAAGAT
ATAGTCTGTGCTTGCATGAAAGTGTAAAGATTCCACAAGAGAACTGCATAGGTAGTAGCGA
ACTTATGTGAACGACAACCTCAAAAATGATAAAAGTTAAGACTTATAGTTCTTACATATGTT
ATTTAAAATAAATAAAAAACCTTAAGAATACTTGTTTTAAGTAATTACTATGTTAATATTAT
GCTAGGTGATGAAAAATGGAAGTGACTCATGGTAGAGGGTATGTGTATTTAGTATAATACC
ATATAGTATGGTGTGTAATAATATAGACATCCAGTATTAACAAATGAAATTGAAGAAGATTTA
ATTAATATATTAACAAAATAGCTAAAGATAATAAATTTCAAATATTAGAATGTAATAGTGAC
AAAGACCACATACATTTACTAATAAATTGTTCCACCACAACACTATATACCAGATATGATAAA
AGCATTAAAATGTGTATCGACAAGGTTGTTAATGAAAAACATGGAGAACAGTTGAAAAAG
AAATTATGGGGAGAACATCTTTGGAATCCTAGTTATTTCTGTTGCTACTGTATCAGAAAATAC
AGAAGAACAGATAAGAAAATATATTAATAATCAGAAAAAGCAAGTAAAGTGAGGTGGTAGT
AGTGGAAAAAGCTTATAGGTTTAGAATGTATCCAATAAAAAACAGCAAGAGTTAATTAACA
AACTTTTGGATGTTGTAGATTTGTATATAATAAGTATCTTGCTAAAAGAATAGATGTTTATA
AAAACGATAAAGAACTTTTACTTATAAACAGTGTAGTTCTGATTTGACCAATTTAAAAAAA
GAATTAACATGGCTTAAGGAACCTGACAAATTTTCACTACAAAACGCCTTAAAGATTTAGA
TAATGCATATAAAAAATTCTTTAAAGAAAAAGCAGGATTTCTAAATTTAAATCGAAGAAAAT
TAATAGATTTTTCATATAAAAATTAACCTTTACAAATGGAAACATTATGTATTGTGGTCAACATAT
AAAACCTAACCTAACTTGGTATGGTTAAGATAAGGGATAAACAAGTACCTCAAGGTAGAATA
CTTAATGCTACTATATCTAAAGAACCAAGTGGTAGATATTATGTATCATTATGCTGTACTGA
TGTAGACATTGAAGCATTTGAAAATACTAATAATCAGATAGGTTTAGATTTAGGAATTAAG
AATTTTGTATCTCAAGTTGTGGAGAATTTATAGAAAATCCTAAGTATCTTAAGAAGTCATTAA
ACAACTTTCTAAATTACAAAGAGAATTATCGAGAAAGACAATCGGTAGTTTAAATAGAAAC
AAAGCAAGATTAAGGTTGCAAGACTTCAAGAACATATAGCCAATCAAAGAAAGGATTTTCT
ACAAAACTATCTACTAAATTAATAAAAGAGAATGATATTATTTGCATAGAAGATTTACAAGT
AAAGAATATGATTAAAAATCGTAACTATCTCGCTTAATTTCTGATGTATCATGGTCAGAAT
TTATTCGTCAATTAGAATACAAGGCTAATTGGCATGGTAGACAAATTGTAAAGGTAGATAAA
TTCTTTGCAAGTTCACAAATATGCAATAAATGTGGGTATAAAAACGAGGAAGTGAAGGACT
TAAATATAAGAGAATGGATTTGTCCTAGTTGTAATGACACTCACGATAGAGATATAAATGCA
AGTATAAATATATTAAGAAGGATTAAGACTAATAACAACCTCAAAATAAATAACTTATGTAA
GAACCGTAGGAACCTACGGGGATAGCCTGTGGAGAATTAGTAAGACATATTTTAGTATGCAA
AATTCTGTGAAGCAGGAACCCTGTGACTTTAGTCATGGGAGGTTTCAG

Nukleotidsequenz des Vektor pCR®2.1

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGA
CAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT
AGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA
CAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAC
TAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAC
TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT
GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT
AGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCAC
GTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAAT
AGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAA
GGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCA
GAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGCTATCTGGACAAGGAAAACGCAAGC
GCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGTTTTAT
GGACAGCAAGCGAACCAGGAAATGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCA
AAGTAAACTGGATGGCTTCTTTCGCCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAA
GAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCG
CTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGC
CGTGTTCGGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC
CTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGC
GCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCG
GGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAAT
GCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC
GAGCGAGCACGTAAGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC
AGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGAT
CTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCAGAAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTG
GATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCC
GTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCCTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAAG
GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTGTTGCCTTC
TGTTTTTGTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCT
TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGG
GCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGT
GATAACACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGTCAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCTTATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATA
CCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAA
CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
TAAAACCTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAT
CCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
GAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTG
GTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGCGC
AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC
CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTG
CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTG
AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCCGTAAGCGGCA
GGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC
CTGTCCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAG

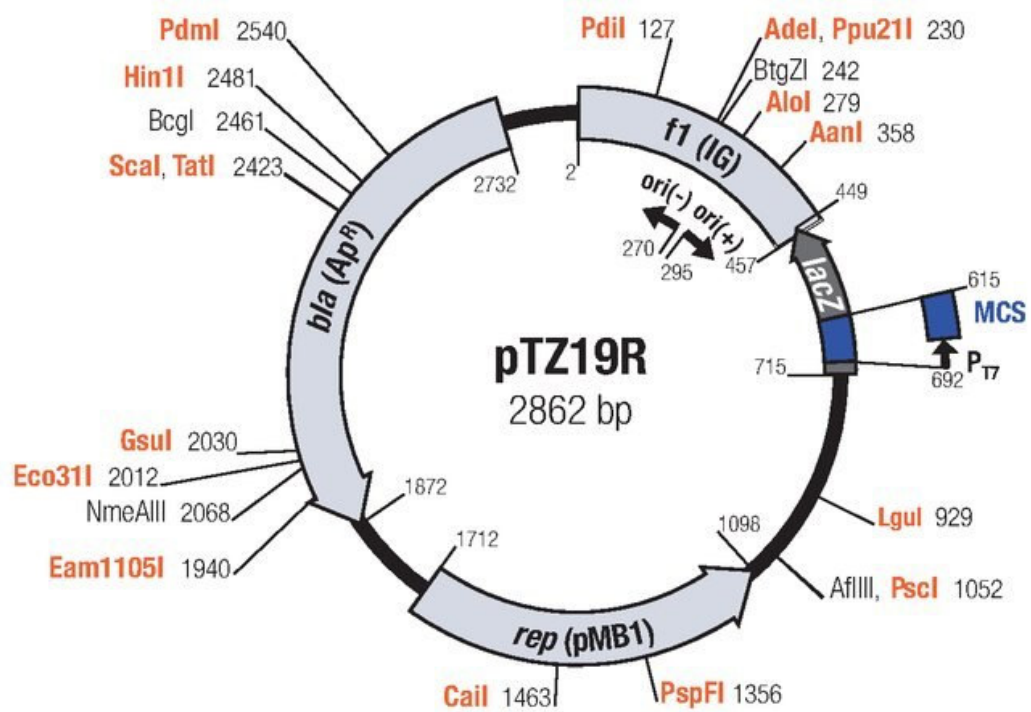
CCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
 ACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
 ATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

Anhang C: Genkarten von pCR2.1 und pTZ19R



Comments for pCR[®]2.1
 3929 nucleotides

- LacZ* gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Professor für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, für die Verbesserungsvorschläge, die Unterstützung und die Korrektur dieser Arbeit. Ohne seine Ideen, seine aufmunternden Worte, sowie die vielen konstruktiven Gespräche, die wir in den vergangenen Jahren geführt haben, wäre die vorgelegte Arbeit in ihrer nun entstandenen Form undenkbar gewesen. Ich bedanke mich insbesondere dafür, dass er bis zum Schluss an mich geglaubt hat, mich tatkräftig unterstützt hat und motiviert hat.

Sehr dankbar bin außerdem meinem Betreuer im Labor, für die schöne Zeit, die ich mit ihm verbracht habe. Die gute Laune, die er jeden Tag auf's neue verbreitet hat, hat sehr dazu beigetragen, dass ich gerne im Labor gearbeitet habe. Vielen Dank auch für die zahllosen Tipps, die er mir gegeben hat, ohne diese hätte ich zweifellos wesentlich länger an meinen Versuchen gesessen, wenn sie überhaupt gelungen wären.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern, dafür bedanken, dass sie es mir ermöglicht haben, überhaupt erst soweit zu kommen, dass ich die Möglichkeit hatte eine eigene Dissertation verfassen zu können. Ihr habt mich, wo es euch möglich war, unterstützt und mir oft den Rücken freigehalten. Vielen Dank dafür!

Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit aufgeführt sind. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form weder als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung noch bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Morad Tajjiou

Mainz, 2020